



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2018

**Sara Filipa
Limas dos
Anjos**

**Estudo de alterações séricas no lipidoma em
obesidade pediátrica**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2018

**Sara Filipa
Limas dos
Anjos**

Estudo de alterações séricas no lipidoma em obesidade pediátrica

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, especialização bioquímica clínica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues, Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Dr. António Frederico Ramos Morais Cerveira, Assistente Graduado Sénior de Patologia Clínica –Seção de Bioquímica Clínica do Centro Hospitalar Baixo Vouga, E.P.E. Aveiro.

Apoio financeiro da FCT, da União Europeia, QREN, no âmbito do Programa Operacional Temático Fatores de Competitividade (COMPETE).

Apoio financeiro à unidade de investigação QOPNA (projeto PEst-C/QUI/UI0062/2013; FCOMP-01-0124-FEDER-037296) e RNEM (LISBOA-01-0145-FEDER-402-022125).



INICIATIVA DE PARCERIAS
PÚBLICO-PRIVADAS
para o desenvolvimento
de projetos de investigação e inovação



Aos meus pais e irmãos
pelo apoio incondicional.

O júri

presidente

Professor Doutor Brian James Goodfellow

Professor Auxiliar do Departamento de Química da
Universidade de Aveiro

Professora Doutora Luisa Alejandra Helguero

Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Ciências
Médicas da Universidade de Aveiro

**Professora Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis
Marques Domingues**

Professora Associada com Agregação do Departamento de
Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço aos meus orientadores, a Professora Rosário Domingues e o Dr. Frederico Cerveira, por todo o apoio, dedicação, amizade e ensinamentos ao longo deste ano de dissertação. Aprendi imenso convosco.

A todo grupo de espetrometria de massa por me receberem tão bem, pela ajuda, pelo companheirismo e pela disponibilidade. Não podia ter desejado melhor grupo de trabalho. Muito obrigada. Agradeço em especial à Tânia e ao Simone, por toda a paciência, pela vontade em ajudar e por tudo o que me ensinaram.

Agradeço ao Professor Pedro Domingues pela colaboração neste trabalho e pela preciosa ajuda.

Agradeço à D. Dores e aos técnicos do Serviço de Patologia Clínica, do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, por me receberem tão bem e pela ajuda neste trabalho.

Obrigada a todos os meus amigos, em especial a Sara, a Rita e a Joana por toda a diversão, companheirismo, apoio e cumplicidade. À Filipa por estar sempre presente, por toda a paciência, pelos momentos de descontração e pela constante motivação. É bom saber que posso contar convosco. Um enorme obrigada.

Aos meus pais por me terem permitido alcançar esta conquista, por todo o carinho, apoio e incentivo e por serem o meu porto seguro. À minha irmã por todas as conversas, conselhos e por cuidar de mim desde sempre. Mesmo longe, o teu apoio é indescritível. Ao meu irmão por demonstrar tanta curiosidade e ouvir as minhas explicações e, acima de tudo, por me fazer rir, brincar e voltar a ser criança. Obrigada por tudo.

A todos, um enorme e sincero obrigada.

palavras-chave

Obesidade, crianças, perfil fosfolipídico, metabolismo lipídico, espectrometria de massa, lipidômica

resumo

A obesidade é considerada um problema de saúde pública, sendo cada vez mais prevalente em crianças e adolescentes. Esta condição é um fator de risco para o desenvolvimento de outras doenças, como a diabetes mellitus tipo 2, as doenças cardiovasculares e a esteatose hepática não-alcoólica. Neste contexto, existe um interesse crescente em estudar os mecanismos patofisiológicos da obesidade, bem como encontrar novos biomarcadores que permitam a prevenção e o diagnóstico precoce das doenças associadas à obesidade. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar as alterações fosfolipídicas no soro de crianças com excesso de peso e obesas, recorrendo a técnicas de espectrometria de massa acopladas à cromatografia, nomeadamente, GC-MS e HPLC-MS e MS/MS.

A análise do perfil de ácidos gordos dos fosfolípidos por GC-MS demonstrou uma diminuição significativa do ácido gordo C18:2 *n*-6 e um aumento do ácido gordo C16:0 e do C18:0 no grupo de crianças com BMI elevado (com excesso de peso e com obesidade) comparativamente às crianças de peso normal. No entanto, não se observaram diferenças significativas entre crianças do sexo feminino e do sexo masculino. Pela análise estatística multivariada aplicada aos resultados obtidos por HPLC-MS e MS/MS, observou-se um aumento significativo no perfil de espécies moleculares de PC e uma diminuição significativa de LPC, PE, SM e PI, tendo especial destaque a diminuição de éteres de PE.

Deste modo, a abordagem lipidômica utilizada neste trabalho permitiu a análise e identificação de espécies moleculares pertencentes a diversas classes de fosfolípidos de crianças saudáveis, com excesso de peso e com obesidade. As alterações fosfolipídicas observadas permitiram distinguir crianças de peso normal das crianças com elevado BMI, no entanto, não permitiram a distinção entre crianças com excesso de peso e obesas. A abordagem lipidômica poderá ser utilizada para reconhecimento de alterações fosfolipídicas, particularmente da classe das LPC, PC e éteres de PE e permitir um diagnóstico precoce de doenças associadas à obesidade.

keywords

Obesity, children, phospholipid profile, lipid metabolism, mass spectrometry, lipidomic

abstract

Obesity is a public health problem which is increasing in children and adolescents. This condition is a risk factor for other pathologies, such type 2 diabetes mellitus, cardiovascular diseases and nonalcoholic fatty liver disease. In this context, there is a growing interest for understand the pathophysiological mechanism of obesity, as well identify biomarkers for prevention and early diagnosis of diseases associated to obesity. Thus, the aim of this work is to evaluate changes in phospholipid profile of overweight and obese children, using mass spectrometry-based approaches coupled with chromatography, like GC-MS and HPLC-MS and MS/MS.

Analysis of fatty acid profile performed by GC-MS revealed a significant decrease of the C18:2 *n*-6 fatty acid and a significant increase of C16:0 and C18:0 fatty acids in children with elevated BMI. However, no significant differences were observed between female and male children. The multivariate statistical test applied to the results obtained by HPLC-MS and MSMS, demonstrated a significant increase of PC molecular species and a significant decrease of LPC, PE, SM and PI molecular species, with special emphasis on the decrease of PE ethers.

In conclusion, the lipidomic approach used in this work allowed the analysis and identification of the phospholipid profile of healthy children, overweight children and obese children. The observed phospholipid alterations allowed to distinguish normal weight children of children with elevated BMI, however no differences were observed between overweight and obese children. The lipidomic approach can be used as a tool for the recognition of phospholipid profile alterations, specially of PC, LPC and PE ethers, and may contribute for the early diagnosis of obesity associated diseases.

Índice

Índice de Figuras.....	iii
Índice de Tabelas.....	vi
Abreviaturas	vii
1. Introdução	1
1.1 Obesidade	1
1.2 Lipidoma humano.....	3
1.3 Lipidómica no estudo da obesidade	6
1.3.1 Alterações no lipidoma plasmático de indivíduos com obesidade.....	6
1.3.2 Alterações no lipidoma plasmático na obesidade pediátrica	15
1.3.3 Alterações no lipidoma plasmático em doenças associadas à obesidade	18
1.3.3.1 Diabetes Mellitus Tipo 2.....	19
1.3.3.2 Doenças Cardiovasculares	21
1.3.3.3 Esteatose Hepática Não-Alcoólica	23
1.4 Objetivos do trabalho	25
2. Materiais e Métodos.....	26
2.1 Reagentes	26
2.2 Crianças em estudo.....	26
2.3 Extração de fosfolípidos do soro de crianças com diferentes índices de massa corporal utilizando a técnica de extração em fase sólida	27
2.4 Quantificação de fosfolípidos através do ensaio de quantificação de fósforo..	28
2.5 Análise e quantificação de ácidos gordos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)	29
2.6 Análise e quantificação das classes de fosfolípidos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS)	30
2.7 Análise estatística.....	31
3 Caracterização do perfil fosfolipídico de crianças com excesso de peso e obesidade	33
3.1 Caracterização da amostra	33
3.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos	34

3.3	Análise do perfil de ácidos gordos dos fosfolípidos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)	37
3.4	Análise do perfil de fosfolípidos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa tandem (HPLC-MS/MS)	39
4.	Discussão	51
5.	Conclusão e Perspetivas Futuras	57
6.	Bibliografia	59
7.	Anexos	69

Índice de Figuras

Figura 1- Efeitos da obesidade no organismo. Adaptado de Schwabe et al. (7). A lipotoxicidade e o aumento da inflamação, característicos da obesidade, originam disfunção de diversos órgãos e, conseqüentemente, aumentam o risco de desenvolver outras doenças.....	2
Figura 2- Principais categorias de lípidos presente em animais e representação de estrutura de cada categoria. Adaptado de Fahy et al.(16)	4
Figura 3- Desenvolvimento da diabetes mellitus tipo 2 associada à obesidade. Adaptado de Virtue et al.24. O excesso de lípidos no organismo leva a uma falha na expansão do tecido adiposo e, conseqüentemente, ao aumento de fluxo de lípidos. Ocorre acumulação ectópica de lípidos que causa efeitos lipotóxicos, nomeadamente resistência à insulina.	19
Figura 4- Formação das placas de ateroma. As partículas de LDL em excesso, verificadas na obesidade, acumulam-se nas paredes dos vasos sanguíneos. Posteriormente, as LDL levam à iniciação de processos inflamatórios, que originam as placas de ateroma. Figura produzida com utilização de “Servier Medical Art”.	22
Figura 5- Desenvolvimento da esteatose hepática não-alcoólica. O aumento da taxa de absorção e a diminuição da taxa de excreção de lípidos têm como consequência o desenvolvimento de esteatose. Por sua vez, a esteatose é responsável por alterar o metabolismo e originar inflamação hepática. Figura produzida com utilização de “Servier Medical Art”.....	24
Figura 6- Composição de ácidos gordos dos extratos fosfolipídicos provenientes do soro de crianças com peso normal (controlo), excesso de peso e obesidade. O perfil de ácidos gordos foi obtido recorrendo a análise por GC-MS. Os resultados encontram-se representados em termos de média±desvio padrão de 8 réplicas biológicas para cada condição (n=8). * p<0,05; ***p<0,001 (ANOVA Bonferroni’s Multiple Comparison Test).	38
Figura 7- Composição de ácidos gordos presentes nos fosfolípidos de amostras de soro de crianças do sexo feminino e do sexo masculino com peso normal (A), excesso de peso (B) e obesidade (C). O perfil de ácidos gordos foi obtido através de análise por GC-MS. Os resultados encontram-se representados em termos de média±desvio padrão de 4 réplicas biológicas para cada condição (n=4).	38
Figura 8- Exemplo de cromatograma obtido por HPLC-MS com a separação das classes fosfolipídicas presentes nas amostras de soro de crianças. As classes das PG, PI e PS eluem entre os 2-3 minutos, a das PE entre os 3-5 minutos, a das PC entre os 8-10 minutos, a das SM entre os 10-12 minutos e a classe das LPC elui entre os 13-16 minutos.	39
Figura 9- (A) Espectro de HPLC-MS, no modo positivo, no tempo de retenção 8-10 minutos, onde eluem as PC. Os valores de m/z correspondentes às espécies moleculares de PC mais abundantes estão assinaladas com uma circunferência. (B) Exemplo de espectro de HPLC-MS/MS do ião	

$[M+H]^+$ da PC (36:4), de m/z 782,57, identificada como PC (16:0/20:4). Neste espectro, pode observar-se o íon fragmento característico da cabeça polar da fosfocolina (colina e grupo fosfato), de m/z 184,1 e, também, os íões fragmento resultantes das perdas neutras de -256 Da e -304 Da, correspondentes às perdas dos ácidos gordos C16:0 e C20:4, respetivamente. 40

Figura 10- (A) Espectro de HPLC-MS, no modo positivo, no tempo de retenção 13-16 minutos, onde eluem as LPC. Os valores de m/z correspondentes às espécies moleculares de LPC mais abundantes estão assinaladas com uma circunferência. (B) Exemplo de espectro de HPLC-MS/MS do íon $[M+H]^+$ da LPC (16:0), de m/z 496,34, com o íon fragmento característico da cabeça polar (colina e grupo fosfato), de m/z 184,1 e com a perda neutra de -256 Da correspondente à perda de RCOOH do ácido gordo C16:0. 41

Figura 11- (A) Espectro de HPLC-MS, no modo positivo, no tempo de retenção 10-12 minutos, onde eluem as SM. Os valores de m/z correspondentes às espécies moleculares de SM mais abundantes estão assinaladas com uma circunferência. (B) Exemplo de espectro de HPLC-MS/MS do íon $[M+H]^+$ da SM (d34:1, SM d18:1/16:0) de m/z 703,50, com o íon fragmento característico da cabeça polar (colina e grupo fosfato), de m/z 184,1, bem como a perda neutra de colina e H_2O , representado pelo íon de m/z 502,5 e o íon correspondente à esfingosina- $2H_2O$, de m/z 264,3. 42

Figura 12- (A) Espectro de HPLC-MS, no modo positivo, no tempo de retenção 3-5 minutos, onde eluem as PE. Os valores de m/z correspondentes às espécies moleculares de PE com maior sinal estão assinaladas com uma circunferência. (B) Exemplo de espectro de HPLC-MS/MS do íon $[M+H]^+$ da PE (34:2) de m/z 716,44, em que se pode observar a perda neutra de 141 Da característica da cabeça polar das PE (etanolamina e grupo fosfato) e, também, os íões de m/z 239,2 e m/z 263,2 correspondentes aos ácidos gordos C16:0 e C18:2, respetivamente, na forma de $[RCO]^+$ 43

Figura 13- (A) Espectro de HPLC-MS, no modo negativo, no tempo de retenção 3-5 minutos, onde eluem as PE. Os valores de m/z correspondentes às espécies moleculares de PE com maior sinal estão assinaladas com uma circunferência. (B) Exemplo de espectro de HPLC-MS/MS do íon $[M-H]^-$ da PE (34:1) de m/z 716, 52, com o íon correspondente à cabeça polar (etanolamina e grupo fosfato) de m/z 140 e com os íões correspondentes aos ácidos gordos C16:0 e C18:1 na forma de $[RCOO]^-$ de m/z 255 e m/z 281, respetivamente. 44

Figura 14- (A) Espectro de HPLC-MS, no modo negativo, no tempo de retenção 2-3 minutos, onde eluem as PG. Os valores de m/z correspondentes às espécies moleculares de PG identificadas estão assinaladas com uma circunferência. (B) Espectro de HPLC-MS, no modo negativo, no tempo de retenção de 2-3 minutos, onde eluem as PS. Os valores de m/z correspondente a uma das espécies moleculares identificada está assinalada com uma circunferência. 45

Figura 15- (A) Espectro de HPLC-MS, no modo negativo, no tempo de retenção 2-3 minutos, onde eluem as PI. Os valores de m/z correspondentes às espécies moleculares de PI mais abundantes estão assinaladas com uma circunferência. (B) Exemplo de espectro de HPLC-MS/MS

do íão $[M-H]^-$ da PI (38:4) de m/z 885,55, com o íão correspondente à cabeça polar (inositol e grupo fosfato) de m/z 241 e com os íões correspondentes aos ácidos gordos C18:0 e C20:4 na forma de $[RCOO]^-$ de m/z 283 e m/z 303, respetivamente. 46

Figura 16- Análise de componentes principais (PCA) com as 166 espécies de fosfolípidos identificadas. **(A)** modo positivo onde a componente principal representa 47,6% de variância geral. **(B)** modo negativo onde a componente principal representa 56,7% de variância geral ... 47

Figura 17- Mínimos Quadrados Parciais- Análise Discriminante (PLS-DA) com as 166 espécies de fosfolípidos identificadas. **(A)** modo positivo onde a componente principal representa 46,4% de variância geral. **(B)** modo negativo onde a componente principal representa 56,3% de variância geral..... 48

Figura 18- Lista de Importância Variável na Projeção (VIP) no modo positivo **(A)** e no modo negativo **(B)**..... 48

Índice de Tabelas

Tabela 1- Espécies lipídicas da classe de TG, DG e FFA aumentadas e diminuídas na obesidade, de acordo com informação da literatura.	7
Tabela 2- Espécies lipídicas de lisofosfolípidos aumentados e diminuídos na obesidade, de acordo com informação da literatura.	10
Tabela 3- Espécies lipídicas da classe dos fosfolípidos aumentadas e diminuídas na obesidade, de acordo com informação da literatura.	11
Tabela 4- Espécies lipídicas de éteres de fosfolípidos aumentados e diminuídos na obesidade, de acordo com informação da literatura.	12
Tabela 5- Espécies lipídicas da categoria das esfingolípidos aumentadas e diminuídas na obesidade, de acordo com informação da literatura.	14
Tabela 6- Espécies lipídicas de lípidos de esteróis aumentadas na obesidade, de acordo com informação da literatura.	15
Tabela 7- Espécies lipídicas de ácidos gordos totais, lisofosfatidilcolinas e éteres de fosfatidilcolina aumentadas e diminuídas na obesidade pediátrica, de acordo com informação da literatura	16
Tabela 8- Valores de referência pediátricos de BMI, percentil de BMI e respetiva interpretação. Adaptado de (89).	27
Tabela 9- Caracterização das crianças com peso normal, excesso de peso e obesidade em termos de sexo, idade, BMI e percentil de BMI. Os valores médios de BMI estão apresentados como média \pm desvio-padrão.	33
Tabela 10- Valores de referência pediátricos para os parâmetros avaliados. Adaptado de (94).	34
Tabela 11- Parâmetros bioquímicos das crianças selecionadas. Os valores a sublinhado encontram-se na gama dos valores aceitáveis e os valores a negrito e sublinhado encontram-se fora do intervalo de referência.	36
Tabela 12- Lista das 136 espécies moleculares de fosfolípidos que variam estatisticamente entre as crianças com obesidade (OB) e as controlo (CT), entre as crianças com excesso de peso (EP) e as controlo (CT) e entre as crianças com excesso de peso (EP) e as com obesidade (OB).	49
Tabela A1- Lista das 166 espécies de fosfolípidos identificadas no soro de crianças de peso normal, com excesso de peso e com obesidade. A classe das PC, LPC, SM e PE foram analisadas no modo positivo na forma de iões $[M+H]^+$. A classe das PE foi, também analisada no modo negativo na forma de iões $[M-H]^-$	69

Abreviaturas

AA	Ácido araquidônico (do inglês <i>arachidonic acid</i>)
ACN	Acetonitrilo
ANOVA	Análise de variância (do inglês <i>analysis of variance</i>)
BMI	Índice de massa corporal (do inglês <i>body mass index</i>)
Cer	Ceramidas (do inglês <i>ceramides</i>)
Ch	Colesterol (do inglês <i>cholesterol</i>)
ChE	Éster de colesterol (do inglês <i>cholesterol ester</i>)
CVD	Doenças cardiovasculares (do inglês <i>cardiovascular diseases</i>)
DG	Diglicerídeos (do inglês <i>diacylglycerols</i>)
DHA	Ácido docosahexaenóico (do inglês <i>docosahexaenoic acid</i>)
dhCer	Dihidroceramida (do inglês <i>dihydroceramide</i>)
DHexCer	Dihexosilceramida (do inglês <i>dihexosylceramide</i>)
EPA	Ácido eicosapentanoico (do inglês <i>eicosapentaenoic acid</i>)
FA	Ácidos gordos (do inglês <i>fatty acids</i>)
FFA	Ácidos gordos livres (do inglês <i>free fatty acids</i>)
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (do inglês <i>gas chromatography–mass spectrometry</i>)
GL	Glicerolípidos (do inglês <i>glycerolipids</i>)
GP	Glicerofosfolípidos (do inglês <i>glycerophospholipids</i>)
HDL	Lipoproteína de alta densidade (do inglês <i>high density lipoprotein</i>)
HexCer	Hexosilceramidas (do inglês <i>hexosylceramides</i>)
HILIC-LC/MS	Cromatografia líquida de interação hidrofílica (do inglês <i>hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry</i>)

HPLC-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (do inglês <i>high-performance liquid chromatography-mass spectrometry</i>)
IDL	Lipoproteína de densidade intermédia (do inglês <i>intermediate-density lipoprotein</i>)
LCAT	Lecitina-colesterol aciltransferase (do inglês <i>lecithin cholesterol acyltransferase</i>)
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (do inglês <i>low density lipoprotein</i>)
LPC	Lisofosfatidilcolina (do inglês <i>lysophosphatidylcholine</i>)
LPE	Lisofosfatidiletanolamina (do inglês <i>lysophosphatidylethanolamine</i>)
LPI	Lisofosfatidilinositol (do inglês <i>lysophosphatidylinositol</i>)
LPL	Lisofosfolípidos (do inglês <i>lysophopholipids</i>)
LPS	Lisofosfatidilserina (do inglês <i>lysophosphatidylserine</i>)
MHexCer	Monohexosilceramida (do inglês <i>monohexosylceramides</i>)
MS/MS	Espectrometria de massa <i>tandem</i>
MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados (do inglês <i>monounsaturated fatty acids</i>)
<i>m/z</i>	Massa/carga
NAFLD	Esteatose hepática não alcoólica (do inglês <i>nonalcoholic fatty liver disease</i>)
PA	Ácido fosfatídico (do inglês <i>phosphatidic acid</i>)
PC	Fosfatidilcolina (do inglês <i>phosphatidylcholine</i>)
PCA	Análise de componentes principais (do inglês <i>principal component analysis</i>)
PC-O	Éter de fosfatidilcolina (do inglês <i>phosphatidylcholine ether</i>)
PC-P	Plasmalogéneos de fosfatidilcolina (do inglês <i>phosphatidylcholine plasmalogens</i>)
PE	Fosfatidiletanolamina (do inglês <i>phosphatidylethanolamine</i>)
PE-O	Éter de fosfatidiletanolamina (do inglês <i>phosphatidylethanolamine ether</i>)

PG	Fosfatidilglicerol (do inglês <i>phosphatidylglycerol</i>)
PI	Fosfatidilinositol (do inglês <i>phosphatidylinositol</i>)
PL	Fosfolípidos (do inglês <i>phospholipids</i>)
PLA2	Fosfolipase A2 (do inglês <i>phospholipase A2</i>)
PLS-DA	Mínimos Quadrados Parciais- Análise Discriminante (do inglês <i>Partial Least Square-Discriminant Analysis</i>)
PS	Fosfatidilserina (do inglês <i>phosphatidylserine</i>)
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados (do inglês <i>polyunsaturated fatty acids</i>)
SFA	Ácidos gordos saturados (do inglês <i>saturated fatty acids</i>)
SM	Esfingomielinas (do inglês <i>sphingomyelins</i>)
SP	Esfingolípidos (do inglês <i>sphingolipids</i>)
SPE	Extração de fase sólida (do inglês <i>solid phase extraction</i>)
ST	Lípidos esteróis (do inglês <i>sterol lipids</i>)
T2DM	Diabetes mellitus tipo 2 (do inglês <i>type 2 diabetes mellitus</i>)
THexCer	Trihexosilceramida (do inglês <i>trihexosylceramide</i>)
TSH	Hormona estimuladora da tiroide (do inglês <i>thyroid-stimulating hormone</i>)
TG	Triglicerídeos (do inglês <i>triglycerides</i>)
VIP	Importância Variável na Projeção (do inglês <i>Variable Importance in the Projection</i>)
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade (do inglês <i>very low density lipoprotein</i>)

1. Introdução

1.1 Obesidade

A obesidade é uma condição cada vez mais prevalente na atualidade, tanto em adultos como em crianças e adolescentes, levando ao aumento da morbidade e da mortalidade (1). Dado o rápido aumento da sua prevalência na população mundial, a obesidade é considerada um problema de saúde pública, pelo que o estudo dos seus mecanismos patofisiológicos é cada vez mais importante (2–4). Esta condição caracteriza-se por um aumento do índice de massa corporal (BMI, do inglês *body mass index*) que relaciona o peso corporal de um indivíduo com a sua altura. A obesidade ocorre quando o BMI atinge valores acima de 30 kg/m². Por sua vez, os indivíduos com peso normal possuem BMI abaixo de 25 kg/m², enquanto os indivíduos com BMI entre 25 e 30 kg/m² apresentam excesso de peso (5,6). A causa mais comum da obesidade é o excesso de ingestão de alimentos, muitas vezes associado à menor atividade física, porém esta condição pode, também, ser influenciada por fatores genéticos e comportamentais (3,5).

A obesidade origina alterações metabólicas que podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de doenças cardiovasculares (CVD, do inglês *cardiovascular disease*), diabetes mellitus tipo 2 (T2DM, do inglês *type 2 diabetes mellitus*) e doenças hepáticas, entre outras, agravando, deste modo, os seus efeitos nefastos (4). O aumento de peso corporal observado em indivíduos obesos está associado ao aumento do tecido adiposo, devido ao crescimento hipertrófico dos adipócitos (revisto em (7)). Este crescimento permite o armazenamento de uma maior quantidade de lípidos no tecido adiposo, o que previne, numa fase inicial da patologia, uma exposição excessiva de outros órgãos aos lípidos, inclusive aos ácidos gordos (FA, do inglês *fatty acids*) e aos triglicerídeos (TG, do inglês *triglycerides*) (7). No entanto, o tecido adiposo apresenta uma capacidade limitada de se expandir, pelo que em indivíduos obesos, ocorre também uma maior libertação de ácidos gordos livres (FFA, do inglês *free fatty acids*) e TG na corrente sanguínea (7). Assim, na obesidade observa-se uma maior concentração plasmática de FFA e TG, ocorrendo acumulação ectópica de lípidos noutros tecidos, como o tecido hepático, o muscular e o pancreático (7). Esta acumulação ectópica pode levar a respostas compensatórias nos tecidos, nomeadamente ao aumento de oxidação de FA. Todavia, esta

resposta geralmente não é suficiente face às elevadas concentrações de FA, o que origina uma deposição crónica de gordura que, consequentemente, favorece a lipotoxicidade, da qual resulta a ativação de vias inflamatórias, disfunção celular e lipoapoptose (7). A lipotoxicidade está associada à resistência à insulina e ao aumento de gordura no fígado que podem originar, respetivamente, o desenvolvimento de T2DM e esteatose hepática não-alcoólica (NAFLD, do inglês *nonalcoholic fatty liver disease*) (7). Deste modo, a lipotoxicidade e a inflamação influenciam o desenvolvimento de complicações associadas à obesidade, uma vez que aumentam o risco de desenvolvimento destas doenças crónicas (3) (Figura 1).

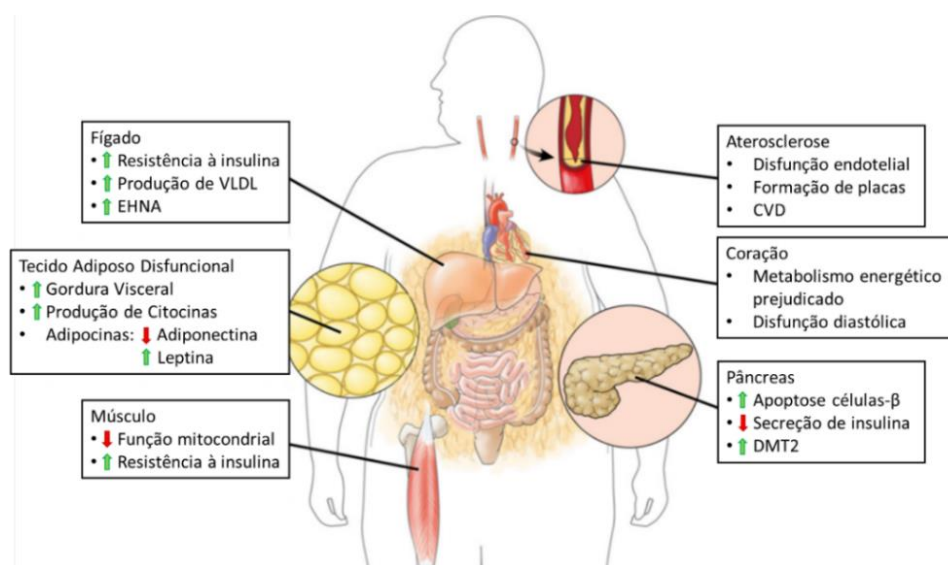


Figura 1- Efeitos da obesidade no organismo. Adaptado de Schwabe et al. (7). A lipotoxicidade e o aumento da inflamação, característicos da obesidade, originam disfunção de diversos órgãos e, consequentemente, aumentam o risco de desenvolver outras doenças.

A obesidade é, também, caracterizada por um estado de inflamação crónica de baixo grau, que advém da ativação de diversas vias inflamatórias. Até há poucos anos, considerava-se que os adipócitos tinham como função apenas armazenar lípidos. No entanto, hoje em dia, sabe-se que também desempenham funções endócrinas (8). Estas células apresentam um papel hormonal importante na regulação do metabolismo, uma vez que secretam um grande número de adipocinas, destacando-se a adiponectina e a leptina (8). A adiponectina é responsável pelo aumento da sensibilidade à insulina no músculo e no fígado e da oxidação de FFA e pela diminuição das concentrações plasmáticas, musculares e hepáticas de FFA e de TG (9). Em indivíduos obesos, as concentrações de adiponectina são menores, pelo que ocorre resistência à insulina e alteração do metabolismo lipídico (9). Por sua vez, a leptina influencia a ingestão de alimentos, uma vez que atua no hipotálamo, dando a sensação de saciedade (10). Apesar

das concentrações de leptina, em indivíduos obesos, serem elevadas devido ao aumento do tecido adiposo, o seu efeito não é o esperado, o que sugere uma diminuição da sensibilidade a esta hormona (10). É ainda de referir que existem diversas citocinas pró-inflamatórias que são produzidas pelo tecido adiposo, nomeadamente interleucina 6 (IL-6) e TNF- α (11,12). Para além disso, os adipócitos recrutam macrófagos, originando um aumento do número destas células do sistema imune no tecido adiposo de indivíduos obesos (13,14). Os macrófagos, são responsáveis pela produção de citocinas, promovendo a disfunção dos adipócitos, a resistência do tecido adiposo à insulina, a libertação de FA na corrente sanguínea e a deposição ectópica de lípidos no fígado (7,8). Assim, o tecido adiposo é responsável pela produção de adipocinas, bem como pelo aumento de macrófagos no mesmo, o que causa a inflamação associada à obesidade, podendo desencadear processos que levam ao desenvolvimento de outras patologias.

Deste modo, a obesidade tem vindo a tornar-se uma condição com forte impacto na sociedade, dada as patologias que pode originar. O estudo do perfil lipídico em sistemas biológicos, incluindo no plasma, pode ser realizado com recurso à lipidómica, um grupo de técnicas baseadas na espetrometria de massa que fornece informação a nível molecular das espécies lipídicas. A lipidómica permite, assim, analisar estruturalmente uma enorme diversidade de lípidos (15,16), podendo ser fulcral para o estudo da obesidade e para a identificação de biomarcadores lipídicos que contribuam para o diagnóstico precoce e monitorização de doenças cuja prevalência é superior em indivíduos obesos (17).

1.2 Lipidoma humano

Os lípidos representam uma das principais classes de biomoléculas, desempenhando diversas funções no organismo, visto que integram as membranas biológicas, são uma fonte energética e apresentam funções como sinalizadores e reguladores do metabolismo (16,17). No geral, os lípidos, em mamíferos, podem ser classificados em 5 categorias principais (Figura 2): FA, glicerolípidos (GL, do inglês *glycerolipids*), glicerofosfolípidos (GP, do inglês *glycerophospholipids*), esfingolípidos (SP, do inglês *sphingolipids*) e lípidos esteróis (ST, do inglês *sterol lipids*) (16,18). No organismo humano estas classes estão presentes nos tecidos e no plasma, que apresenta uma enorme diversidade lipídica (17). Os FFA são pouco abundantes no plasma, sendo o

mais comum o ácido oleico (C18:1), seguido pelo ácido palmítico (C16:0) e pelo ácido esteárico (C18:0) e encontrando-se algumas espécies de FA polinsaturados (PUFA, do inglês *polyunsaturated fatty acids*) em menor abundância, como por exemplo o ácido linoleico (C18:2) e o ácido araquidônico (AA, do inglês *arachidonic acid*) (C20:4) (17). Pelo contrário a categoria dos GL, da qual fazem parte os TG e os diglicerídeos (DG, do inglês *diacylglycerols*), constitui uma das classes de lípidos mais abundantes a nível plasmático (17). Outra categoria muito abundante a nível plasmático é a dos GP, que engloba as classes de ácido fosfatídico (PA), fosfatidiletanolamina (PE, do inglês *phosphatidylethanolamine*), fosfatidilglicerol (PG, do inglês *phosphatidylglycerol*), fosfatidilinositol (PI, do inglês *phosphatidylinositol*), fosfatidilserina (PS, do inglês *phosphatidylserine*) e fosfatidilcolina (PC, do inglês *phosphatidylcholine*) (16–18). Os SP também são encontrados no plasma e incluem as ceramidas (Cer, do inglês *ceramides*), as hexosilceramidas (HexCer, do inglês *hexosylceramides*) e as esfingomielinas (SM, do inglês *sphingomyelins*), que são as mais abundantes desta categoria (16,17). Por último, os ST podem ser encontrados na sua forma livre ou na forma esterificada, sendo os mais abundantes o colesterol (Ch, do inglês *cholesterol*) e os ésteres de colesterol (ChE, do inglês *cholesterol ester*) (17). Em indivíduos saudáveis, os lípidos plasmáticos mais abundantes são os TG, os ChE, os GP, nomeadamente PC e lisofosfatidilcolina (LPC, do inglês *lysophosphatidylcholine*), e as SM (17,19). Dentro de cada classe podem distinguir-se diversas espécies moleculares que resultam da esterificação com diferentes FA, o que aumenta a diversidade e complexidade do lipidoma (17).

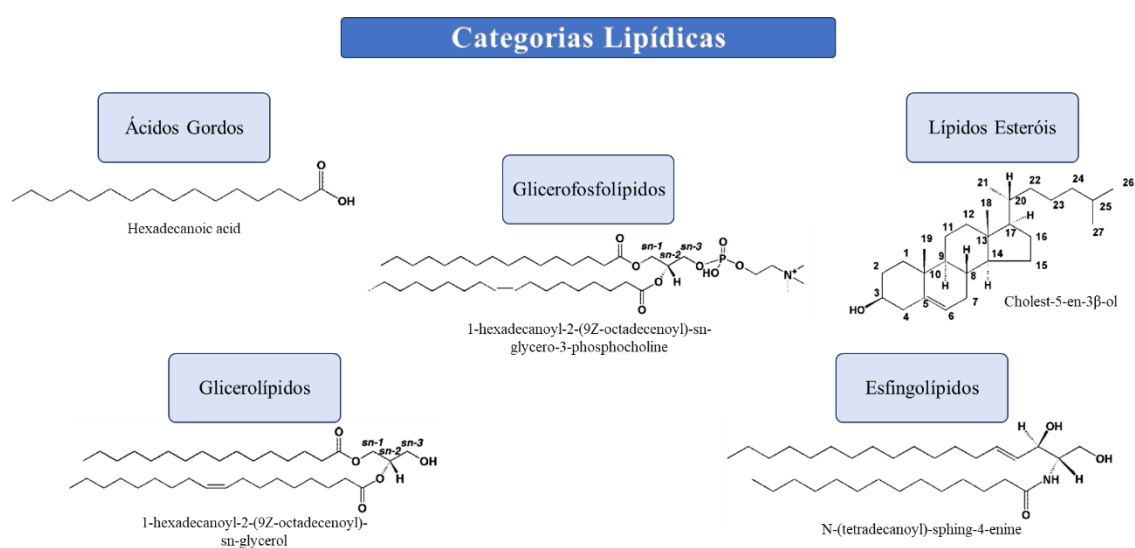


Figura 2- Principais categorias de lípidos presente em animais e representação de estrutura de cada categoria. Adaptado de Fahy et al.(16)

Os lípidos apresentam uma grande diversidade estrutural, o que pode associar-se às diversas funções que desempenham no organismo, sendo o seu transporte essencial para que desempenhem essas funções. Estas biomoléculas, uma vez que são hidrofóbicas, não circulam livremente na corrente sanguínea, sendo transportadas por lipoproteínas. Estas apresentam uma constituição característica, consoante a sua classificação em quilomicron, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL, do inglês *very low density lipoprotein*), lipoproteínas de densidade intermédia (IDL, do inglês *intermediate-density lipoproteins*), lipoproteínas de baixa densidade (LDL, do inglês *low density lipoprotein*) e lipoproteínas de alta densidade (HDL, do inglês *high density lipoprotein*) (20). Os quilomicrons são lipoproteínas com elevado teor de TG, enquanto as VLDL e as IDL são predominantemente constituídas por TG e ChE (20,21). Por sua vez, as LDL transportam, principalmente, ChE, SM e Cer, tendo, ainda, na sua composição fosfolípidos (PL, do inglês *phospholipids*), enquanto as HDL são ricas em proteínas, apresentando, a nível lipídico, PC, SM, LPC, Ch, PE e éteres de PE (PE-O, do inglês *phosphatidylethanolamine ether*) (20,22). Estas partículas de transporte apresentam uma composição lipídica característica, pelo que a alteração das suas concentrações contribui para o diagnóstico de doenças que estejam associadas à alteração do metabolismo lipídico (4).

O lipidoma humano é bastante complexo, uma vez que existe uma grande diversidade estrutural de espécies lipídicas. O perfil lipídico encontra-se alterado em diversas doenças (23–27). No entanto, os níveis de lípidos plasmáticos são, também, influenciados por outros fatores, nomeadamente o sexo e a idade dos indivíduos (28–33), bem como a sua etnia (32,34) e o seu estilo de vida (30,34–39). A influência destas características individuais deve ser tida em conta, uma vez que podem afetar a determinação de biomarcadores lipídicos a nível plasmático. Deste modo, vários fatores não patológicos podem influenciar o perfil lipídico dos indivíduos, no entanto, estas alterações são mais proeminentes em situações patológicas, das quais é exemplo a obesidade, T2DM, CVD e NAFLD, pelo que os lípidos podem ser considerados potenciais biomarcadores de doenças. As alterações do lipidoma plasmático podem ocorrer como consequência de alterações em órgãos alvo, sendo desejável determinar biomarcadores específicos de cada patologia.

1.3 Lipidômica no estudo da obesidade

1.3.1 Alterações no lipidoma plasmático de indivíduos com obesidade

Os indivíduos obesos apresentam, geralmente, dislipidemia, que se caracteriza por níveis elevados de LDL e VLDL e diminuídos de HDL (23,40,41). Estas diferenças nas concentrações de lipoproteínas, podem traduzir-se em alterações no perfil lipídico a nível molecular, pelo que o conhecimento do lipidoma de indivíduos obesos pode permitir o diagnóstico e a avaliação da sua suscetibilidade a outras doenças (20,27,42). A obesidade tem um forte impacto no lipidoma humano, tendo-se observado alterações de diversas classes lipídicas que serão elucidadas nos parágrafos seguintes, nomeadamente a nível de FFA, DG, TG, PL e seus éteres, SM, HexCer, Ch e ChE.

Diversos estudos têm reportado que os indivíduos obesos apresentam variações dos níveis plasmáticos de espécies lipídicas pertencentes às classes de FA, DG e TG (Tabela 1), sendo esta última classe uma das mais abundantes a nível plasmático (17,23,43). Os resultados relativos aos níveis de TG e DG são contraditórios, diferindo consoante a população em estudo (23,42–44). Assim, estudos com populações constituídas por homens e mulheres (23,44) ou apenas homens (42) verificaram que ocorre um aumento de DG e de TG totais no plasma em indivíduos obesos, o que está de acordo com o observado em ratinhos (25). Adicionalmente, verificaram que com o aumento do perímetro abdominal dos indivíduos, ocorre, também, um aumento de TG contendo FA saturados (SFA, do inglês *saturated fatty acids*) ou FA monoinsaturados (MUFA, do inglês *monounsaturated fatty acids*) e uma diminuição dos TG que contêm PUFA, o que pode refletir um aumento de lipogénese a nível hepático, favorecendo a incorporação de FA com menor número de insaturações nos TG (45). Por outro lado, um estudo apenas em mulheres obesas (43) verificou que quando o tecido adiposo visceral aumenta, ocorre uma diminuição de DG e de TG, principalmente de espécies moleculares de TG contendo PUFA de cadeia longa. Estes resultados podem parecer discrepantes, por se observar uma diminuição dos níveis totais de TG, mas por outro lado, à semelhança dos estudos referidos anteriormente (23,42,44), verifica-se uma diminuição de TG com PUFA em mulheres obesas (43). Estes dados revelam a importância de estudar as alterações do perfil lipídico a nível molecular, na obesidade, em função do sexo, ou seja, as variações em homens e mulheres separadamente. Contudo, parece haver uma

tendência, de forma geral, para o aumento de TG e de DG o que pode advir do aumento da ingestão de alimentos, subjacente à obesidade, e ao aumento de lipoproteínas (46). Quando a quantidade de FA excede as necessidades energéticas, os FA em excesso são convertidos em TG e armazenados no fígado e no tecido adiposo ou incorporados em lipoproteínas (46). Por sua vez, os TG, por ação de lipases, como a lipoproteína lipase, podem ser hidrolisados, originando FFA e DG (revisto em (4)). Estes dados estão de acordo com o aumento de FFA em indivíduos obesos (6,47–49), verificando-se o mesmo para ratinhos (50). Deste modo, em indivíduos obesos ocorre um aumento dos níveis de FA, bem como de TG e de DG.

Tabela 1-Espécies lipídicas da classe de TG, DG e FFA aumentadas e diminuídas na obesidade, de acordo com informação da literatura.

Aumentado na obesidade							
Classe	Espécie	Ref.	Matriz	Classe	Espécie	Ref.	Matriz
TG	46:0	(42)	Plasma	TG	54:2	(23,44)	Soro e Plasma
	46:1	(42)			54:3	(42)	Plasma
	46:2	(42)			54:4	(42)	
	48:0	(42)			54:5	(23,42)	
	48:1	(42)			54:6	(42)	Plasma
	48:2	(42)			54:7	(42)	
	48:3	(42)			56:3	(23)	Soro
	48:4	(43)			56:4	(23)	
	49:1	(42)			56:5	(23)	
	49:2	(42)			56:6	(23,42)	Soro e Plasma
	51:0	(44)			56:7	(42)	Plasma
	50:1	(42,44)			DG	34:1	(42)
	50:2	(42)		36:2		(42)	
	50:3	(42,44)		36:3		(42)	
	50:4	(42)		38:4		(44)	
	51:2	(42,44)		42:8		(43)	
	51:3	(42)		FFA		(6)	Plasma
	52:1	(44)			14:0	(49)	
	52:2	(42,44)			16:0	(49)	
	52:3	(42)			16:1	(49)	
	52:4	(42)			17:1	(47)	
	52:5	(42)			18:1	(49)	
	52:6	(42)			20:4	(49)	
	53:2	(42,44)					
	53:3	(42)					
	54:1	(42,44)					
Diminuído na obesidade							
Classe	Espécie	Ref.	Matriz	Classe	Espécie	Ref.	Matriz

TG	49:2	(43)	Plasma	TG	56:6	(43)	Plasma
	50:4	(43)			56:7	(43)	
	51:2	(43)			56:8	(43)	
	51:3	(43)		DG	36:3	(43)	Plasma
	54:1	(43)			36:4	(43)	
	56:5	(43)					

Os lisofosfolípidos (LPL, do inglês *lysophospholipids*) encontram-se alterados em situações de obesidade, como representado na Tabela 2 (6,23). Os fatores genéticos são um dos parâmetros relacionados com a ocorrência da obesidade, tendo sido sugerido que estes contribuem para alterações metabólicas (19). Em gémeos monozigóticos discordantes para a obesidade, isto é, comparando indivíduos obesos com os seus gémeos de peso normal (10 a 25 Kg de diferença), verificou-se um aumento dos níveis das LPC nos obesos (23), enquanto em indivíduos obesos de uma população geral, diversos estudos reportaram uma diminuição das concentrações de LPC (6,19,24,25,27,30,47). Estes dados contraditórios, podem dever-se à exclusão de fatores genéticos no estudo em gémeos monozigóticos (23), isto é, considerando-se apenas a obesidade adquirida devido ao estilo de vida (19). Assim, a diminuição dos níveis de LPC, na obesidade, pode dever-se a fatores genéticos, avaliados nos diversos estudos em indivíduos obesos de uma população geral.

As LPC desempenham funções na inflamação, no entanto, dependendo da estrutura das espécies moleculares, podem exercer efeitos pró- ou anti-inflamatórios (6,51). As LPC contendo PUFA estão geralmente associadas a efeitos anti-inflamatórios, enquanto as LPC esterificadas com SFA parecem ter efeitos pró-inflamatórios (52). Esta tendência parece suportar a diminuição de LPC 18:1 e LPC 18:2 e o aumento de LPC 14:0 e LPC 18:0 em indivíduos obesos (40,47) e em ratinhos (25,50,53), indicando uma diminuição das vias anti-inflamatórias e um favorecimento das vias pró-inflamatórias e a consequente inflamação característica da obesidade. Todavia, um estudo verificou uma diminuição de espécies de LPC pró-inflamatórias, nomeadamente da LPC 16:0 e da LPC 18:0 na obesidade (6). Estes resultados parecem contraditórios, uma vez que a obesidade é um estado de inflamação crónica de baixo grau, logo era esperado um aumento das LPC pró-inflamatórias, contudo, pode sugerir-se uma diminuição da sensibilidade a sinais pró-inflamatórios de LPC em indivíduos obesos (6). A diminuição de várias espécies de LPC insaturadas, como a LPC 18:2 e a LPC 22:6, está, ainda, associada à proteína C-reativa, um marcador de inflamação (19,36). Assim, indivíduos com baixos níveis de LPC apresentam uma maior concentração de proteína C-reativa e, consequentemente, maior

grau de inflamação. Contudo, a diminuição de algumas espécies de LPC saturadas, como a LPC 18:0 e a LPC 20:0 (19), também está associada à proteína C-reativa, o que pode estar relacionado com a diminuição da sensibilidade a sinais pró-inflamatórios das LPC, anteriormente referida. Contudo, apesar de vários estudos apontarem para a diminuição desta classe lipídica (19), o aumento das LPC está relacionado com o risco de CVD, uma vez que estes lípidos são um componente importante nas LDL oxidadas, que promovem a aterogénese (54). Deste modo, o papel das LPC na obesidade e consequente inflamação é pouco conhecido dada a contrariedade da diminuição desta classe na obesidade (19). De modo semelhante, outras classes de LPL, como as lisoPE (LPE, do inglês *lysophosphatidylethanolamine*), lisoPS (LPS, do inglês *lysophosphatidylserine*) e lisoPI (LPI, do inglês *lysophosphatidylinositol*), encontram-se aumentadas ou diminuídas na obesidade em humanos (6,24,30,44) (Tabela 2) e em ratinhos (50). As alterações descritas nestas classes sugerem que a obesidade afeta o metabolismo de LPL, possivelmente devido a uma resposta dos hepatócitos à carga crescente de FA que ocorre nesta condição (6). Os LPL plasmáticos podem ser formados no sangue pela ação da lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT, do inglês *lecithin cholesterol acyltransferase*), que remove um FA das PC e os transfere para o Ch, ou podem ser originados pela ação da fosfolipase A2 (PLA2, do inglês *phospholipase A2*), que remove um FA dos PL, ou podem, ainda, ter origem hepática (6,30,47). Adicionalmente, doenças hepáticas, como a NAFLD, alteram o metabolismo de LPL, tendo efeitos nas concentrações desta classe semelhantes à obesidade (6,55). Assim, as alterações dos níveis desta classe lipídica podem dever-se a stress metabólico no fígado, podendo, os LPL, constituir biomarcadores para estudar a homeostase hepática (6). No caso particular das LPC, parece existir uma relação com os seus níveis reduzidos e a resistência à insulina, pelo que a diminuição dos níveis desta classe podem ser indicadores de maior risco de indivíduos obesos desenvolverem T2DM (6,44). Deste modo, a diminuição de LPL verificada em indivíduos obesos, particularmente das LPC, pode estar relacionada com a dieta, a adiposidade, a alteração do metabolismo de lipoproteínas, a resistência à insulina e a gordura no fígado (24,25). Todavia, é de notar que existem discrepâncias em relação ao aumento e diminuição de algumas espécies lipídicas de LPL (Tabela 2), pelo que são necessários mais estudos para clarificar estas alterações.

Tabela 2- Espécies lipídicas de lisofosfolípidos aumentados e diminuídos na obesidade, de acordo com informação da literatura.

Aumentado na obesidade							
Classe	Espécie	Ref.	Matriz	Classe	Espécie	Ref.	Matriz
LPC	14:0	(40)	Plasma	LPE	20:5	(6)	Plasma
	16:0	(23,42)			22:5	(6)	
	18:0	(40)			22:6	(6)	
	18:1	(23)		LPI	18:0	(6)	Plasma
	18:2	(23)			18:1	(6)	
	20:4	(23)	Soro		18:2	(6)	
LPE	16:0	(6)	Plasma		20:3	(6)	
	18:0	(6)		20:4	(6)		
	20:4	(6)		22:6	(6)		
Diminuído na obesidade							
Classe	Espécie	Ref.	Matriz	Classe	Espécie	Ref.	Matriz
LPC		(30)	Plasma	LPC	20:4	(6,19)	Plasma
		(25)			20:5	(19)	
	15:0	(19)			22:5	(19,24)	
	16:0	(6)			22:6	(19,24)	
	17:0	(24)		LPE		(30)	Plasma
	18:0	(6)			14:1	(6)	
	18:1	(6,19,24,40,47)			16:0	(44)	
	18:2	(6,19,24,27,47)			18:1	(6,24)	
	18:3	(19,24)			18:2	(6,24)	
	20:0	(19)			20:0	(6)	
	20:1	(6,24)			20:2	(6)	
	20:2	(24)		LPI	16:1	(6)	Plasma
	20:3	(6)		LPS	20:4	(24)	Plasma

A categoria dos GP, para além dos LPL, engloba a classe dos PL, que apresenta uma grande diversidade de espécies moleculares e é, no seu conjunto, um dos grupos de lípidos mais abundantes a nível plasmático (17). Na Tabela 3 são apresentadas algumas espécies lipídicas de PL que se encontram alteradas na obesidade, de acordo com a literatura. As PC, são uma classe de PL, que, de forma geral, se encontram aumentadas em indivíduos obesos (15,42,43,47). Este aumento foi correlacionado com a diminuição da atividade da enzima LCAT ou da PLA2, anteriormente referidas (30,47). Estas enzimas ao hidrolisarem as PC, originam LPC, sendo que a diminuição da sua atividade justifica os níveis elevados de PC e os níveis reduzidos de LPC descritos. Adicionalmente, as alterações nos níveis das PC podem dever-se ao aumento da sua síntese hepática sendo, posteriormente, secretadas para o plasma (50). Ainda assim, os níveis de espécies de PC contendo ácido docosahexanóico (DHA, do inglês *docosaheptaenoic acid*) diminuem com

o aumento do tecido adiposo subcutâneo e visceral (23). Sendo a obesidade um estado associado ao aumento da inflamação, justifica-se que PC contendo DHA se encontrem diminuídas, uma vez que o DHA é um PUFA *n*-3, apresentando efeitos anti-inflamatórios (revisto em (56)). Contudo, não se sabe se a diminuição das PC contendo DHA em indivíduos obesos se deve ao tecido adiposo ou se está relacionado com alguma alteração na dieta (23). As restantes classes de PL, como PI, PE e PG, de forma geral, também, se encontram aumentadas na obesidade em humanos (15,19,42,43) e em ratinhos (25,53). Os PL, particularmente as PC, são necessários para a formação da monocamada exterior das lipoproteínas, rodeando os lípidos neutros, como TG e ChE (57). Deste modo, o aumento da biossíntese hepática de PC, verificado na obesidade, parece ser necessária para acompanhar o aumento da produção de partículas de lipoproteínas, em indivíduos obesos (57). Adicionalmente, os PL, também, constituem a monocamada que envolve as gotículas lipídicas, existentes a título de exemplo no fígado, onde são armazenados os TG sintetizados a partir do excesso de FA, de modo a prevenir a lipotoxicidade (57). Assim, a homeostase fosfolipídica hepática é essencial para manter a integridade celular do fígado e facilitar a secreção de lipoproteínas (57).

Tabela 3- Espécies lipídicas da classe dos fosfolípidos aumentadas e diminuídas na obesidade, de acordo com informação da literatura.

Aumentado na obesidade							
Classe	Espécie	Ref.	Matriz	Classe	Espécie	Ref.	Matriz
PC	32:0	(42)	Plasma	PC	40:5	(47)	Plasma
	34:2	(15,42)			40:6	(47)	
	34:3	(43)		PE	36:2	(42)	Plasma
	36:3	(42)			38:4	(15,43)	
	36:4	(42,43)			38:6	(42)	
	38:3	(42,47)			40:6	(42)	
	38:4	(47)		PI		(19)	Plasma
	38:5	(47)			38:4	(15)	
Diminuído na obesidade							
Classe	Espécie	Ref.	Matriz	Classe	Espécie	Ref.	Matriz
PC	32:2	(43)	Plasma	PE	40:6	(43)	Plasma
	38:6	(23)	Soro	PI	34:1	(43)	Plasma

Os éteres de PL são outra classe lipídica alterada na obesidade, como resumido na Tabela 4, que apresenta alguns exemplos de éteres de PL aumentados e diminuídos nesta condição. Nesta classe, em vez da habitual ligação éster entre o glicerol e uma das cadeias

de FA, ocorre uma ligação éter (15,36), destacando-se, pela sua abundância, os plasmalogêneos, caracterizados por apresentarem uma ligação éter de vinilo (42,58). Esta classe encontra-se diminuída em indivíduos obesos, quando comparados com os seus gémeos monozigóticos de peso normal (23), todavia, estes dados não estão concordantes com outros estudos que apontam para um aumento dos níveis de éteres de PL na obesidade, nomeadamente de éter de PC (PC-O, do inglês *phosphatidylcholine ether*) e PE-O (15,42,43). À semelhança do sugerido anteriormente para as LPC, esta discrepância pode advir da consideração de fatores genéticos que influenciam o aumento dos níveis desta classe. Diversos trabalhos associam os éteres de PL com propriedades antioxidantes (58), pelo que o aumento desta classe lipídica pode advir de uma resposta antioxidante ao aumento do stress oxidativo na obesidade (15). Contudo, outros estudos apontam para uma diminuição de PC-O e plasmalogêneos de PC (PC-P, do inglês *phosphatidylcholine plasmalogens*) (24,44), o que pode dever-se ao consumo destas espécies pelo organismo devido ao aumento de stress oxidativo. Deste modo, os indivíduos obesos, podem apresentar um aumento ou diminuição de éteres de PL, que apresentam uma atividade antioxidante, pelo que são necessários mais estudos de modo a avaliar e compreender a variação desta classe como resposta do organismo ao stress oxidativo presente na obesidade.

Tabela 4- Espécies lipídicas de éteres de fosfolípidos aumentados e diminuídos na obesidade, de acordo com informação da literatura.

Aumentado na obesidade							
Classe	Espécie	Ref.	Matriz	Classe	Espécie	Ref.	Matriz
PC-O	34:2	(15)	Plasma	PE-O	32:5	(43)	Plasma
	36:1	(15)			36:5	(42,43)	
	36:2	(15)			38:4	(15)	
	38:3	(15)			38:7	(42)	
	38:4	(15)					
	42:5	(43)					
Diminuído na obesidade							
Classe	Espécie	Ref.	Matriz	Classe	Espécie	Ref.	Matriz
PC-O	32:0	(44)	Plasma	PC-O	38:7	(23)	Soro
	34:1	(23)	Soro		40:6	(24)	Plasma
	34:2	(24)	Plasma	PC-P	32:0	(44)	Plasma
	34:3	(24)			34:2	(44)	
	36:3	(23,24)	Soro e Plasma	36:2	(44)		
	36:5	(24)	Plasma	PE-O	36:3	(23)	Soro

Os SP são outra categoria de lípidos cujas concentrações se encontram alteradas na obesidade (Tabela 5). Estes lípidos encontram-se nas membranas celulares e nas lipoproteínas, sendo que desta categoria se destacam as SM como as mais abundantes (17,21). As SM, de forma geral, encontram-se aumentadas na obesidade em humanos (19,23,27,30,43,47) e em ratinhos (25,53). No estudo em gêmeos monozigóticos já referido, onde se considera apenas o efeito do estilo de vida na obesidade, independentemente dos fatores genéticos, as SM de cadeia curta e média aumentam com a gordura abdominal, enquanto as de cadeia longa não apresentam variação (23). Todavia, em estudos onde os fatores genéticos são tidos em conta, isto é, numa população de indivíduos obesos, existe um aumento de SM de cadeia longa, bem como de espécies polinsaturadas (27,47). Este aumento dos níveis de SM, não apresenta associação com a resistência à insulina (47), no entanto está de acordo com as alterações verificadas na concentração das lipoproteínas, uma vez que as LDL, que transportam grande parte das SM plasmáticas, se encontram aumentadas na obesidade (47,59). Os níveis do precursor de biossíntese das SM, as Cer, encontram-se inalterados na obesidade (30,43,60). Apesar destes resultados, era de esperar que os níveis de Cer se encontrassem elevados, uma vez que estas podem ser importantes mediadores da resistência à insulina e da inflamação induzida pela obesidade (48) e que o excesso de FA promove a produção de várias citocinas que regulam a biossíntese de lípidos desta classe (21). As Cer são, também, precursoras da síntese de mono- (MHexCer, do inglês *monohexosylceramides*), di- (DHexCer, do inglês *dihexosylceramide*) e tri- hexosilceramidas (THexCer, do inglês *trihexosylceramide*), que estão descritas como diminuídas em indivíduos obesos (30). Pelo contrário, os precursores metabólicos das Cer, as dihidroceramidas (dhCer, do inglês *dihydroceramide*), aumentam com o BMI (30,60). Estas alterações no metabolismo de SP podem contribuir para a patogénese do tecido adiposo, bem como para os efeitos pró-trombóticos e inflamatórios, que influenciam as condições patológicas associadas à obesidade, nomeadamente a T2DM e CVD (61). Deste modo, as classes de SP relacionam-se de forma diferente com a obesidade. Enquanto as SM e as dhCer se encontram aumentadas, as Cer e HCer encontram-se inalteradas ou diminuídas em indivíduos obesos.

Tabela 5- Espécies lipídicas da categoria das esfingolípídeos aumentadas e diminuídas na obesidade, de acordo com informação da literatura.

Aumentado na obesidade								
Classe	Espécie	Ref.	Matriz	Classe	Espécie	Ref.	Matriz	
SM		(30)	Plasma	SM	42:3	(47)	Plasma	
	32:2	(47)			42:4	(47)		
	33:2	(47)			43:2	(43)		
	34:2	(23,27,47)			Soro e Plasma	43:3		(47)
	34:3	(47)	Plasma	Cer	40:0	(44)	Plasma	
	36:0	(47)		dhCer		(30)	Plasma	
	36:1	(27)			18:0	(60)		
	36:2	(23,27,47)	Soro e Plasma		20:0	(60)		
	36:3	(47)	Plasma		22:0	(60)		
	40:2	(47)			24:1	(60)		
	40:3	(43)						
Diminuído na obesidade								
Classe	Espécie	Ref.	Matriz	Classe	Espécie	Ref.	Matriz	
Cer	41:2	(43)	Plasma	DHCer		(30)	Plasma	
MHCer		(30)	Plasma	THCer		(30)	Plasma	

Por último, a classe dos ST na qual se destacam o Ch e ChE, pela sua abundância a nível plasmático, também se apresentam alterações em indivíduos obesos (Tabela 6) (17). Tanto o Ch como os ChE plasmáticos encontram-se aumentados na obesidade, sendo que os níveis deste último podem refletir as elevadas concentrações de LDL, nesta condição em humanos (42,44) e em ratinhos (53). O Ch pode ter origem endógena ou na dieta, sendo essencial na membrana celular, uma vez que contribui para a sua fluidez e é um dos constituintes dos microdomínios lipídicos, que desempenham um importante papel na sinalização celular (62). Em condições normais, após ingestão de alimentos, o Ch é transportado para o fígado onde é convertido em ChE e, posteriormente, englobado nas lipoproteínas (4). No entanto, quando as concentrações de Ch são excessivas, ocorre acumulação de VLDL e LDL, o que contribui para a iniciação da formação de placas de ateroma e, consequentemente, desenvolvimento de CVD (4). Assim, o aumento dos níveis de Ch e de ChE reportados na literatura no caso da obesidade, pode estar associado às concentrações superiores de LDL e VLDL e pode ser um fator de risco de CVD.

Tabela 6- Espécies lipídicas de lípidos de esteróis aumentadas na obesidade, de acordo com informação da literatura.

Aumentado na obesidade							
Classe	Espécie	Ref.	Matriz	Classe	Espécie	Ref.	Matriz
Ch		(19)	Plasma	ChE		(44)	Plasma
		(42)			16:0	(42)	
					16:1	(42)	

As classes lipídicas referidas apresentam diferentes FA na sua constituição, o que lhes confere diversidade estrutural. Como referido, os FA também se encontram na sua forma livre, podendo modular respostas inflamatórias através dos seus recetores acoplados à proteína-G (46,63). Dos FA destacam-se os PUFA, particularmente os *n*-3 e os *n*-6 (56). A família dos PUFA *n*-3 inclui o C20:5, designado ácido eicosapentanoico (EPA, do inglês *eicosapentaenoic acid*) e o C22:6, designado DHA(64). Estes PUFA apresentam efeitos benéficos no níveis de LDL e de HDL, uma vez que levam à sua diminuição e aumento, respetivamente (64). Os PUFA *n*-3 são, ainda, precursores de mediadores anti-inflamatórios, o que favorece a diminuição da inflamação no tecido adiposo e, ainda, melhora a sensibilidade à insulina (6,63–65) Por sua vez a família dos PUFA *n*-6, inclui o C20:4, designado AA, que é um precursor dos eicosanóides pró-inflamatórios e está associado ao aumento dos níveis de Ch e TG (56,64,66).

Em suma, a obesidade é responsável pela alteração do lipidoma dos indivíduos, afetando diversas classes lipídicas. Apesar destes dados, existem muitas discrepâncias nos resultados de estudos que avaliam o perfil lipídico na obesidade, sendo uma possível causa a dieta dos indivíduos e a origem dos lípidos da dieta (37,39). É, ainda, de notar que, a maior parte dos estudos em humanos é realizada em adultos, sendo importante determinar o perfil lipídico de crianças obesas.

1.3.2 Alterações no lipidoma plasmático na obesidade pediátrica

Em diversos países a obesidade nas crianças e adolescentes tem vindo a aumentar (2), tendo sido verificada uma associação entre o aumento de BMI e o aumento de mortalidade a longo prazo (1). O BMI das crianças é avaliado com recurso ao percentil em que as mesmas se encontram, sendo comparadas com crianças do mesmo sexo e idade (67). Assim, crianças com excesso de peso apresentam percentil de BMI igual ou superior a 85 e inferior a 95, enquanto as crianças obesas apresentam percentil de BMI superior a

95 (67). Apesar da obesidade infantil ter um grande impacto na sociedade e da associação entre a obesidade e o lipídoma, pouco se sabe sobre a alteração do perfil lipídico na obesidade pediátrica.

A alteração mais estudada na obesidade infantil é a que ocorre a nível dos FA, podendo existir uma relação com o perfil plasmático destes e o grau de obesidade (68). Na sua maioria, os estudos publicados reportam os níveis de FA plasmáticos totais, que incluem os FA constituintes dos ChE, PL, TG e, ainda, os FFA, verificando-se que algumas espécies se encontram aumentadas e outras diminuídas (68) (Tabela 7). Os resultados relativos aos níveis totais de FA *n*-3, de FA *n*-6, de SFA, de MUFA e de PUFA não são concordantes (68–71), o que se pode dever ao efeito da dieta dos indivíduos e da atividade de algumas enzimas, como a estearoil-CoA dessaturase e a elongase (70). Apesar destas discrepâncias, diferentes estudos verificaram alterações semelhantes em vários FA, como o aumento dos níveis de FA 16:1(*n*-7) e a diminuição de FA 18:2 (*n*-6) em crianças obesas (68–71). As elevadas concentrações de FA 16:1(*n*-7) e os níveis reduzidos de FA 20:4 (*n*-6) e FA 22:5 (*n*-6) estão associados a um aumento do risco de desenvolver síndrome metabólica (71), sendo úteis para avaliar a situação clínica destes pacientes. Deste modo, o perfil plasmático de FA pode estar associado com o grau de obesidade e com o risco de desenvolvimento de complicações.

Tabela 7- Espécies lipídicas de ácidos gordos totais, lisofosfatidilcolinas e éteres de fosfatidilcolina aumentadas e diminuídas na obesidade pediátrica, de acordo com informação da literatura

Aumentado na obesidade							
Classe	Espécie	Ref.	Matriz	Classe	Espécie	Ref.	Matriz
LPC	14:1	(72)	Plasma	FA totais	18:3 (<i>n</i> -3)	(68–71)	Plasma
FA totais	14:0	(69,70)	Plasma		20:1 (<i>n</i> -9)	(70)	
	16:0	(69–71)			20:3 (<i>n</i> -6)	(69,70)	
	16:1 (<i>n</i> -7)	(69–71)			20:5 (<i>n</i> -3)	(68)	
	16:1 (<i>n</i> -9)	(71)			22:6 (<i>n</i> -3)	(71)	
	18:1 (<i>n</i> -9)	(69–71)					
Diminuído na obesidade							
Classe	Espécie	Ref.	Matriz	Classe	Espécie	Ref.	Matriz
PC-O	34:1	(73)	Soro	LPC	18:2	(72,73)	Soro
	34:2	(73)			20:4	(73)	
	34:3	(73)			20:6	(72)	
	36:2	(73)		FA totais	18:2 (<i>n</i> -6)	(68–70)	Plasma
	36:3	(73)			20:2 (<i>n</i> -6)	(70)	
	38:2	(73)			20:4 (<i>n</i> -6)	(71)	
LPC	18:1	(72,73)	Soro		22:5 (<i>n</i> -6)	(71)	

Para além das alterações de FA plasmáticos totais, é possível observar alterações de espécies lipídicas, nomeadamente da classe dos PC-O e das LPC, na obesidade infantil (73,74) (Tabela 7). Em crianças obesas, a análise do soro mostrou um decréscimo em algumas espécies de PC-O (73), o que está de acordo com o verificado em estudos com adultos (24,44), ainda que seja difícil comparar estudos de crianças e de adultos devido ao possível impacto do crescimento no metabolismo (73). Esta diminuição pode dever-se a uma maior utilização destas espécies no organismo, particularmente de plasmalogéneos, uma vez que apresentam propriedades antioxidantes, desempenhando, assim, funções durante o stress oxidativo na obesidade infantil (73). Desta classe lipídica, destaca-se a espécie PC-O 36:2, cujas concentrações diminuídas parecem ser uma consequência do estilo de vida das crianças obesas, levando à obesidade que pode ser tratada com intervenções comportamentais, visto que após alteração da dieta e do exercício físico, os níveis desta espécie aumentam em indivíduos obesos (74). Tal justifica-se uma vez que, num estudo em crianças obesas cujo estilo de vida foi alterado de modo a originar perda peso, as crianças que efetivamente perderam peso após esta alteração comportamental, apresentavam, no início do estudo, níveis de PC-O 36:2 significativamente mais baixos do que as crianças obesas que não perderam peso após alteração do estilo de vida (74). Deste modo, estes resultados sugerem que as concentrações deste metabolito, antes da alteração do estilo de vida, podem ser um fator preditivo da perda de peso em crianças obesas após esta mudança comportamental (74). Em relação aos níveis de LPC, estes encontram-se aumentados, ao contrário do que acontece nos adultos, o que pode dever-se ao aumento da lipólise ou à dieta, uma vez que a composição em FA dos PL séricos reflete parcialmente os FA ingeridos diariamente (73). No entanto, ocorre uma diminuição de LPC insaturadas em crianças com obesidade (73) e um aumento das concentrações de LPC saturadas, estando estas últimas associadas a efeitos pró-inflamatórios, o que está de acordo com o aumento da inflamação na obesidade (52). Da classe das LPC, as espécies LPC 18:1, LPC 18:2 e LPC 20:4 encontram-se aumentadas em crianças obesas que perderam peso após as alterações no estilo de vida, como dieta e exercício físico, quando comparadas com crianças obesas que não perderam peso (74). O aumento de espécies de LPC em indivíduos que apresentaram redução de peso, pode ser causado por diferenças na dieta, pelo aumento da lipólise e/ou redução da oxidação de FA, levando ao aumento dos FA disponíveis para a biossíntese de LPC (74). É, ainda, de referir que a diminuição das concentrações de LPC 18:2, verificada na obesidade infantil, está associada a vários fatores de risco de CVD, nomeadamente, ao aumento do tecido adiposo visceral, aumento

de TG séricos e diminuição de HDL, enquanto o aumento dos níveis de LPC 14:1 está associado aos mesmos fatores de risco, incluindo a resistência à insulina (72). Estes dados sugerem que, para além da relação com a alteração do estilo de vida, as LPC podem ser indicadores do risco de CVD associados com a obesidade. Assim, ocorre uma redução dos níveis de PC-O e um aumento dos níveis de LPC saturadas em crianças obesas. Estas classes parecem relacionar-se com a obesidade infantil e permitir o prognóstico de outras patologias, no entanto são necessários mais estudos para verificar as relações propostas.

O perfil lipídico dos primeiros meses de vida pode estar associado com o risco de excesso de peso ou até mesmo de desenvolver obesidade, em idades mais tardias (75). As concentrações das espécies lipídicas PC 34:4 e LPC 14:0 estão relacionadas com o aumento de peso nos primeiros 6 meses de vida, contudo, apenas os níveis elevados da LPC 14:0 aos 6 meses de idade estão fortemente relacionados com o aumento de peso, e até mesmo com a obesidade, aos 6 anos (75). Estes dados sugerem que os níveis desta espécie lipídica são preditivos de obesidade mais tardia (75). Para além disso, o FA presente nesta espécie lipídica, o C14:0, está relacionado com o estado de obesidade, com a inflamação associada à mesma e com a resistência à insulina em adultos (47,66). Deste modo, a espécie lipídica LPC 14:0, pode constituir um biomarcador para a obesidade mais tardia, bem como para complicações associadas à mesma.

1.3.3 Alterações no lipidoma plasmático em doenças associadas à obesidade

Um dos objetivos dos estudos de lipidómica na obesidade é compreender ou prever o desenvolvimento de complicações associadas à mesma, como a T2DM e as CVD. De facto, estas patologias foram relacionadas com alterações do lipidoma, como será descrito. Assim, seria interessante avaliar se as variações lipídicas que ocorrem em indivíduos obesos podem refletir alterações preditivas de doenças, como T2DM, CVD e NAFLD, permitindo atuar numa forma preventiva e evitar o desenvolvimento e evolução dessas patologias (revisto em (4)). Para além disso, a obesidade combinada com outras doenças metabólicas, como hipertensão e dislipidemia, resulta na síndrome metabólica (41). O conhecimento das alterações lipídicas que ocorrem especificamente em cada doença pode determinar biomarcadores, contribuindo para um diagnóstico mais precoce ou preventivo destas complicações da obesidade.

1.3.3.1 Diabetes Mellitus Tipo 2

A obesidade origina diversas alterações metabólicas que podem levar a que os indivíduos obesos apresentem uma diminuição da sensibilidade à insulina o que, consequentemente, pode causar resistência à insulina e T2DM (5). Estas complicações podem desenvolver-se devido ao aumento da lipotoxicidade nos hepatócitos e nas células β -pancreáticas, exacerbando a inflamação e a apoptose celular (47,76). A apoptose das células β -pancreáticas leva a uma diminuição da libertação de insulina, favorecendo a T2DM (Figura 3). Adicionalmente, o fator pró-inflamatório TNF- α promove a libertação de FFA, que atuam no músculo e no fígado, aumentando a resistência à insulina (8). A identificação de espécies lipídicas associadas à T2DM pode ser importante uma vez que poderá permitir a identificação de biomarcadores de modo a identificar indivíduos com obesidade em risco de desenvolver T2DM (25).

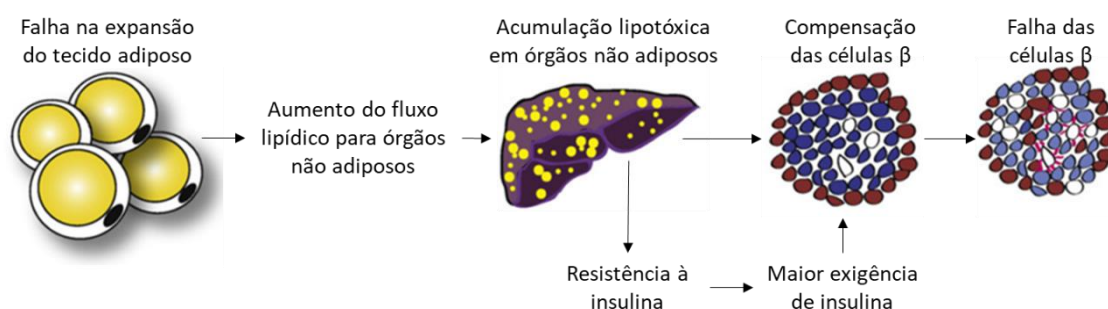


Figura 3- Desenvolvimento da diabetes mellitus tipo 2 associada à obesidade. Adaptado de Virtue et al.24. O excesso de lípidos no organismo leva a uma falha na expansão do tecido adiposo e, consequentemente, ao aumento de fluxo de lípidos. Ocorre acumulação ectópica de lípidos que causa efeitos lipotóxicos, nomeadamente resistência à insulina.

Alguns estudos reportaram que em doentes obesos e com T2DM se observam alterações das classes lipídicas dos TG, dos DG e dos ChE. Indivíduos obesos com resistência à insulina apresentam níveis mais elevados de TG, de DG e de ChE (44). No entanto, nem todas as espécies de TG estão relacionadas de igual modo com a T2DM, pelo que a sua composição em FA é determinante (26,45). Em indivíduos obesos, os TG com SFA e MUFA de cadeia curta estão associados a um aumento da resistência à insulina e do risco de desenvolver T2DM (26,45), enquanto os TG com PUFA de cadeia longa estão associados a uma diminuição do risco (26,43,47). Assim, as concentrações de TG contendo SFA ou MUFA de cadeia curta podem ser marcadores mais específicos da

resistência à insulina do que os níveis totais de TG (45). Todavia, o mesmo não se aplica às espécies de ChE e relativamente aos DG não existe informação (26).

As LPC e as PC são outras classes alteradas na obesidade e na T2DM. As LPC são uma classe de lípidos cujos níveis, de forma geral, se encontram reduzidos em indivíduos obesos, como referido anteriormente (6,19,24,25,27,30,47). Apesar de vários estudos apontarem para uma diminuição das concentrações desta classe em indivíduos obesos com resistência à insulina (23,44) ou T2DM (25), não se sabe se esta alteração advém da T2DM ou da obesidade dos indivíduos por si só, uma vez que existem resultados discrepantes. Deste modo, são necessários mais estudos para explicar esta diminuição de LPC. A redução dos níveis de várias espécies de LPC, como LPC 18:1 e LPC 18:2, está relacionada com um aumento do péptido-C, que é obtido quando a pró-insulina é hidrolisada a insulina, sendo, assim, um marcador de produção de insulina (24). Este aumento na produção de insulina, pode advir da tentativa do organismo compensar a resistência à insulina, verificada em muitos indivíduos obesos. As LPC insaturadas exercem efeitos benéficos no metabolismo da glucose, uma vez que contribuem para a sua absorção pelos adipócitos, de forma independente da insulina, via ativação da proteína cinase C δ (77). Adicionalmente, a administração de LPC em ratinhos com T2DM origina uma diminuição dos níveis de glucose plasmática (77). Assim, esta classe lipídica apresenta uma função na homeostase da glucose, pelo que os níveis diminuídos de LPC em indivíduos obesos e em indivíduos obesos com T2DM podem estar associados ao aumento das concentrações plasmáticas de glucose nestes pacientes (25). Em relação à classe das PC, salienta-se que foi reportado que as PC esterificadas com DHA estão aumentadas em indivíduos com maior sensibilidade à insulina e níveis de insulina menores, tendo sido sugerido que estes lípidos desempenham um papel na sinalização de insulina (23). De modo semelhante ao referido para os TG, o aumento de espécies de LPC e de PC contendo FA de cadeia curta está associado à resistência à insulina (26). Tal verifica-se uma vez que, indivíduos com níveis superiores de algumas espécies, como a PC 32:2 e a PC 36:4, e níveis inferiores de outras, como a PC 43:6 e PC 44:2, apresentam um aumento da resistência à insulina (43,47). Deste modo, a composição em FA das LPC e PC pode fornecer informação sobre o possível risco de desenvolver resistência à insulina e T2DM.

Por fim, as Cer são outra classe lipídica alterada na T2DM. Indivíduos obesos com T2DM apresentam níveis elevados de algumas espécies de Cer, particularmente da Cer

18:0, e dos seus níveis totais, bem como de dhCer (48,78). O excesso de FA na obesidade e as citocinas pró-inflamatórias, como a TNF- α , libertadas pelos adipócitos, promovem a síntese *de novo* de Cer, o que justifica o aumento das suas concentrações (79). Este aumento leva à lipoapoptose das células β -pancreáticas (79), estando relacionado com a severidade da resistência à insulina e com os níveis plasmáticos de TNF- α (48). Assim, apesar de as Cer se encontrarem inalteradas na obesidade, pode sugerir-se que indivíduos obesos com um aumento de Cer apresentam risco de desenvolver T2DM. As Cer são precursores metabólicos das SM e, apesar desta classe estar aumentada em indivíduos obesos com resistência à insulina, os níveis de SM estão apenas associados à obesidade (43,47). Deste modo, o aumento dos níveis das Cer está relacionado com a T2DM na medida em que leva à apoptose das células β -pancreáticas. A determinação do perfil lipídico dos indivíduos com obesidade pode fornecer informação sobre o risco dos mesmos desenvolverem T2DM, permitindo obter biomarcadores preditivos desta complicação na obesidade.

1.3.3.2 Doenças Cardiovasculares

As CVD são um conjunto de doenças cuja prevalência é superior em indivíduos obesos, estando particularmente associadas ao aumento do tecido adiposo visceral, não se verificando o mesmo em relação ao tecido adiposo subcutâneo (80). A alteração do lipidoma, decorrente da obesidade, leva a um aumento das concentrações de LDL e a uma diminuição de HDL, o que aumenta o risco de desenvolver CVD (23,40,41), muitas vezes relacionadas com dislipidemias e com a formação das placas de ateroma (46). A ocorrência de dislipidemias, particularmente devido aos níveis elevados de LDL, está associada às CVD, na medida em que estas partículas, quando em excesso, podem acumular-se nas paredes dos vasos sanguíneos e promover a formação das placas de ateroma, comprometendo o fluxo de sangue e aumentando o risco de desenvolver CVD, tais como enfarte do miocárdio ou acidentes vasculares cerebrais(4,81) (Figura 4). Deste modo, a determinação da variação da concentração de certas espécies lipídicas, pode fornecer informação mais concreta sobre o risco de desenvolver estas doenças (82).

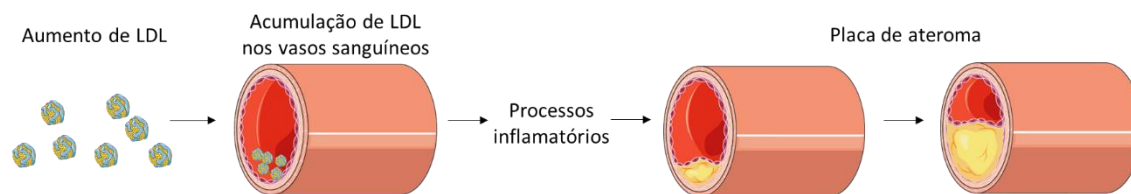


Figura 4- Formação das placas de ateroma. As partículas de LDL em excesso, verificadas na obesidade, acumulam-se nas paredes dos vasos sanguíneos. Posteriormente, as LDL levam à iniciação de processos inflamatórios, que originam as placas de ateroma. Figura produzida com utilização de “Servier Medical Art”.

Os níveis mais elevados de TG, de DG e de ChE, estão relacionados com o aumento do risco de CVD (43,82). No entanto, à semelhança do que ocorre para a T2DM, a constituição, em FA, das espécies desta classe é determinante para o seu efeito. Algumas espécies de DG saturadas estão reduzidas em indivíduos com CVD, enquanto espécies monoinsaturadas estão aumentadas (27). Em relação aos TG, observa-se um aumento das concentrações plasmáticas de TG com SFA e uma diminuição das concentrações de TG com PUFA de cadeia longa, associadas às CVD em indivíduos com excesso de peso ou obesidade (43,82,83). De modo semelhante, indivíduos cujos níveis de ChE que contêm SFA ou MUFA de cadeia curta se encontrem aumentados, apresentam maior risco de desenvolver CVD (83). Todavia, é de notar a grande variabilidade nos resultados encontrados que podem advir da diversidade da dieta e do estilo de vida dos indivíduos, bem como das diferentes CVD (27). A razão que origina o aumento destas classes nas CVD ainda é controversa, podendo dever-se ao aumento plasmático das lipoproteínas pró-aterogénicas ou estar relacionado com a retenção dessas lipoproteínas nas paredes dos vasos e com a estabilidade das placas de ateroma (83). Assim, apesar do aumento plasmático de DG, ChE e TG totais estar associado ao maior risco de desenvolver CVD, é importante conhecer as suas composições em FA.

Os GP, associadas anteriormente à obesidade e à T2DM, estão, também, envolvidas nas CVD. Em pacientes com CVD, verifica-se que as LPC se encontram, de forma geral, diminuídas (27), o que reforça a associação entre a obesidade e este tipo de doenças. Como demonstrado anteriormente, existem resultados discrepantes em relação aos níveis das LPC em indivíduos obesos, sendo que alguns estudos apontam para um aumento da LPC 16:0 (23,42) e da LPC 20:4 (23) e outros para uma diminuição das mesmas espécies (6,19). Estas discrepâncias podem dever-se ao diferente risco de desenvolver CVD que cada indivíduo obeso apresenta, uma vez que os níveis destas espécies lipídicas influenciam o desenvolvimento de CVD (82). Assim, foi sugerido que

indivíduos obesos com níveis elevados de LPC 16:0 e/ou LPC 20:4 apresentem um risco menor de CVD, do que indivíduos obesos com níveis diminuídos das mesmas espécies lipídicas (82). Pelo contrário, tanto adultos como adolescentes, com níveis diminuídos de LPC 18:2 e aumentados de LPC 14:1 que são, respetivamente, anti- e pró-inflamatórios, apresentam maior risco de desenvolver CVD, uma vez que estas alterações nos níveis lipídicos foram associadas a fatores de risco, tais como aumento do tecido adiposo visceral e TG séricos, bem como diminuição de HDL (72). A diminuição dos níveis plasmáticos totais de LPC em indivíduos obesos com CVD, parece contraditória dada a associação desta classe lipídica com a inflamação e a sua presença nas placas de ateroma (84). Contudo, esta diminuição pode ser mais proeminente em espécies anti-inflamatórias ou pode refletir um aumento do catabolismo de LPC e sua remoção da circulação (84). Outras classes de GP, como as PC, PG, PE, PI, PE-O e PC-O, têm sido relacionadas de forma negativa ou positiva com o risco de desenvolver CVD (27,43). Deste modo, diversas classes de GP estão relacionadas com o risco de desenvolver CVD, sendo que esta relação depende da espécie lipídica em causa.

Por último, as SM, particularmente a SM 34:2, apresentam uma relação com as CVD, ao contrário do que se verifica para a T2DM (83). Algumas espécies desta classe, como a SM 36:1 e a SM 36:2, encontram-se diminuídas em pacientes obesos com CVD (27), enquanto outras, como a SM 38:2 e a SM 34:2, encontram-se aumentadas (82,83). As SM estão presentes em grande quantidade nas LDL, cujos níveis elevados estão associados a um maior risco de desenvolver CVD (22). Deste modo, foi sugerido que os níveis elevados de SM são influenciados pela ocorrência de CVD, mas os mesmos não são responsáveis pelo desenvolvimento e progressão de aterosclerose (85).

1.3.3.3 Esteatose Hepática Não-Alcoólica

A NAFLD é outra doença bastante associada à obesidade e à consequente lipotoxicidade (86), que tem como consequência a alteração do lipidoma dos indivíduos (55). A esteatose hepática define-se como um aumento do teor de TG intra-hepáticos que ocorre quando a absorção hepática de FA e a sua síntese *de novo* é maior do que a oxidação de FA e que a secreção dos mesmos como TG (86). Esta acumulação excessiva de TG intra-hepáticos está associada a alterações de metabolismo da glucose, dos FA e das lipoproteínas, sendo ainda, responsável por inflamação a nível hepático (86) (Figura

5). A esteatose hepática pode ser causada pelo consumo excessivo de álcool, designando-se esteatose hepática alcoólica, ou estar associada a disfunções metabólicas como as decorrentes da obesidade, designando-se NAFLD (86). Assim, e à semelhança das outras doenças mencionadas, o estudo do perfil lipídico pode ser útil na determinação de biomarcadores que possibilitem o diagnóstico precoce.

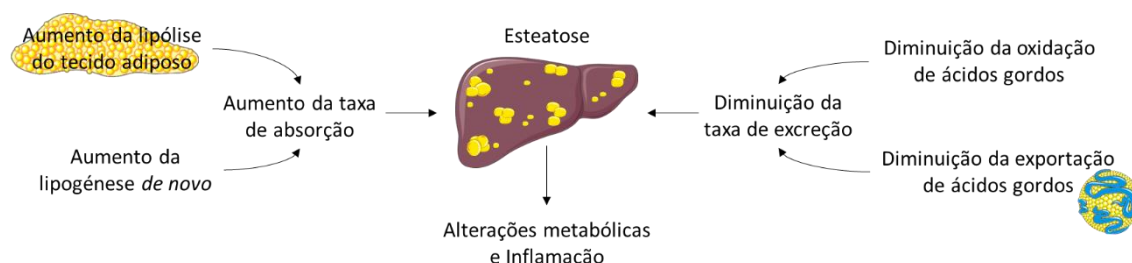


Figura 5- Desenvolvimento da esteatose hepática não-alcoólica. O aumento da taxa de absorção e a diminuição da taxa de excreção de lípidos têm como consequência o desenvolvimento de esteatose. Por sua vez, a esteatose é responsável por alterar o metabolismo e originar inflamação hepática. Figura produzida com utilização de “Servier Medical Art”.

O diagnóstico da NAFLD é realizado, normalmente, com recurso a biópsia ao fígado, pelo que muitos estudos de lipidómica utilizam o tecido hepático como matriz. Neste tecido ocorre um aumento de TG, DG, Ch e SM e uma diminuição de PC, AA, DHA e EPA (87), contudo, existem poucos estudos realizados em plasma, apesar de ocorrerem alterações do lipidoma plasmático nesta doença (55). Indivíduos com NAFLD apresentam um aumento das concentrações plasmáticas de FA totais, de DG e de TG, particularmente dos que apresentam SFA ou MUFA na sua constituição, o que sugere um aumento da lipogénese *de novo* (55,88). Adicionalmente, em pacientes com NAFLD ocorre um aumento de MUFA nos FFA, DG e PL e uma diminuição de FA *n*-3 e FA *n*-6 nos FFA, TG, PC e LPC (55). É, ainda de salientar, a diminuição dos níveis de LPC e éteres de lípidos, em indivíduos com NAFLD, o que pode refletir a diminuição de HDL (88). Deste modo, a NAFLD está associada a alterações no perfil lipídico plasmático dos indivíduos. Destas, destaca-se o aumento de TG saturados e monoinsaturados, que podem refletir o aumento da lipogénese, e a diminuição de LPC e éteres de lípidos, que pode advir da diminuição de HDL.

1.4 Objetivos do trabalho

A obesidade tem vindo a aumentar na sociedade atual, particularmente em crianças e adolescentes. Esta condição tem influência no perfil lipídico dos indivíduos pelo que a lipidómica torna-se fulcral para o estudo dos mecanismos patofisiológicos desta condição. A lipidómica permite a identificação de espécies lipídicas, podendo contribuir para a identificação de biomarcadores lipídicos úteis no diagnóstico e monitorização da obesidade. Para além disso, as alterações do lipidoma decorrentes da obesidade podem estar associadas ao desenvolvimento de outras doenças, nomeadamente T2DM, CVD e NAFLD. Deste modo, a identificação do perfil lipídico de indivíduos com obesidade pode contribuir, também, para um diagnóstico precoce e prevenção destas complicações. Apesar do aumento da obesidade pediátrica e da evidente relação entre a obesidade e o lipidoma, poucos são os estudos lipidómicos realizados em crianças obesas.

Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar as variações do lipidoma de crianças obesas em comparação com crianças não obesas. Assim, iremos analisar o perfil fosfolipídico de crianças de peso normal, com excesso de peso e obesidade. Com recurso à cromatografia líquida acoplada à espetrometria de massa, pretende-se identificar e quantificar espécies lipídicas de diferentes classes de fosfolípidos, bem como caracterizar o perfil de FA presentes dos fosfolípidos, através de cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa. Com estas abordagens poder-se-á identificar o perfil fosfolipídico característico de crianças com excesso de peso ou obesidade que poderá estar associado ao desenvolvimento de outras doenças e avaliar se essas diferenças são dependentes do sexo, ou seja, determinar possíveis diferenças entre o lipidoma de rapazes e raparigas com diferentes BMI.

2. Materiais e Métodos

2.1 Reagentes

Os padrões de fosfolípidos 1-nonadecanoil-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-fosfocolina (LPC 19:0), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (PC 14:0/14:0), 1,2-diacil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (PG 14:0/14:0), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (PE 14:0/14:0) e N-heptadecanoyl-D-erythro-sphingosylphosphorylcholine (SM d18:1/17:0) foram obtidos da *Avanti® Polar Lipids, Inc* (Alabaster, AL, EUA) e usados sem qualquer purificação adicional. O ácido fórmico, o acetato de amónio e o hidróxido de amónio foram obtidos da *Sigma-Aldrich Chemical Co.* (St. Louis, MO, EUA), o ácido perclórico foi adquirido pela *Chem-Lab NV* (Zedelgem, Alemanha), o hidróxido de potássio foi obtido da *LABChem* (Zelienople, PA, EUA) e o molibdato de amónio da *Panreac* (Barcelona, Espanha). O ácido ascórbico e o cloreto de sódio (NaCl) foram adquiridos pela *VWR Chemicals* (Leuven, Bélgica) e o di-hidrogenofosfato de sódio di-hidratado pela *Riedell-de Haën* (Seelze, Alemanha). O clorofórmico (CHCl₃), o acetonitrilo (ACN), o metanol e o hexano, com grau de pureza para HPLC, foram obtidos pela *Fisher Scientific* (Leicestershire, UK) e foram utilizados sem purificação adicional. Finalmente, a água Milli-Q, utilizada em todos os processos, filtrada através um filtro de 0,22 µm e obtida usando o sistema *Milli-Q Millipore system* (Synergy®, Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA).

2.2 Crianças em estudo

As crianças, com idades compreendidas entre os 8 e os 17 anos, foram recrutadas no serviço de Colheitas do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, sendo a sua identidade anónima e tendo-se obtido o respetivo consentimento informado. Para cada criança, obtiveram-se os seguintes parâmetros: idade peso, altura e BMI. Posteriormente, os indivíduos foram divididos em 3 grupos de acordo com o seu BMI: crianças sem excesso de peso ou obesidade (controlo), crianças com excesso de peso e crianças obesas, tendo por base os valores de referência da Tabela 8.

Tabela 8- Valores de referência pediátricos de BMI, percentil de BMI e respetiva interpretação. Adaptado de (89).

BMI (kg/m ²)	Percentil do BMI	Interpretação
<18.5	<5	Baixo peso
18.5 a 24.9	5 a 85	Normal
25 a 29.9	85 a <95	Excesso de peso
>30	>95	Obesidade

As crianças do grupo controlo (4 sexo feminino e 4 sexo masculino) apresentam o percentil de BMI entre 5 e 85, enquanto as crianças com excesso de peso (5 sexo feminino e 9 sexo masculino) apresentam o percentil de BMI entre 85 e 95. Por sua vez, as crianças obesas (5 sexo feminino e 5 sexo masculino) apresentam o percentil de BMI acima de 95. As crianças deste estudo não apresentavam qualquer patologia hepática, alterações a nível da tiroide ou T2DM, o que poderia interferir com o metabolismo lipídico. O soro de cada criança foi obtido e analisado pelo Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, com recurso ao *software* Apollo (sistema de informação para o laboratório de análises clínicas). Após colheita e análise, as amostras de soro foram armazenadas a -80°C até posterior estudo do perfil fosfolipídico. Este trabalho foi aprovado pela comissão de ética do Centro Hospitalar do Baixo Vouga.

2.3 Extração de fosfolípidos do soro de crianças com diferentes índices de massa corporal utilizando a técnica de extração em fase sólida

Os fosfolípidos do soro de crianças controlo (n=8), com excesso de peso (n=14) e com obesidade (n=10) foram obtidos por extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*). Inicialmente adicionou-se 5 µg de padrão interno PC (14:0/14:0) a 100 µL de amostra de soro. Procedeu-se à precipitação de proteínas através da adição de 900 µL de ACN com 1% de ácido fórmico, agitando-se, de seguida, num vórtex durante 30 segundos. Para ocorrer a separação das fases, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para colunas *Hybrid SPE-PL* (Supelco, Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA) acopladas a um sistema *Visiprep SPE Vacuum Manifold* (Supelco, Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA). De seguida, adicionou-se 1 mL de ACN com 1% de ácido fórmico à coluna e, posteriormente, 1 mL de ACN puro. De modo a eluir os fosfolípidos retidos na coluna, adicionou-se 2 x 1mL de ACN com hidróxido de amónio

a 5%, consecutivamente. Estas duas últimas eluições foram coletadas no mesmo tudo e, posteriormente, levadas à secura total através de uma corrente de azoto e armazenadas a -20°C até posterior análise.

2.4 Quantificação de fosfolípidos através do ensaio de quantificação de fósforo

A quantidade total de fosfolípidos no extrato lipídico das amostras de soro (n=32) foi determinada através da quantificação espectrofotométrica de fósforo, tendo por base o método proposto por Barlett e Lewis (90). Os extratos lipídicos previamente secos foram redissolvidos em 300 µL de CHCl₃. Transferiu-se 10 µL de cada amostra, em duplicado, para tubos de vidro e secou-se em corrente de azoto. Adicionou-se 125 µL de ácido perclórico a 70% (m/v) a cada tubo e incubou-se durante 40-60 minutos a 180°C num bloco de aquecimento (*Stuart Block Heater SBH200D*). Os padrões com concentrações entre 0,1 e 2 µg de fósforo foram preparados a partir de uma solução padrão de di-hidrogenofosfato de sódio di-hidratado com 100 µg/mL de fósforo. Estas soluções padrão foram submetidas ao mesmo tratamento que as amostras, com exceção do aquecimento no bloco. Posteriormente, adicionou-se a cada tubo (amostras e padrões) aproximadamente 825 µL de H₂O Milli-Q, 125 µL de molibdato de amónio 2,5% (m/v) e 125 µL de ácido ascórbico 10% (m/v), tendo-se homogeneizado em vórtex após adição de cada solução. De seguida, incubou-se durante 10 minutos a 100°C num banho de água (*Precistern P-Selecta*). Decorridos os 10 minutos, os tubos foram colocados em água fria para promover o arrefecimento.

Por fim, transferiu-se 200 µL de cada solução para uma microplaca de 96 poços e a absorvência foi lida a 797 nm num leitor de microplacas *Multishan GO* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A quantidade de fósforo presente em cada amostra foi calculada por regressão linear a partir da representação gráfica da absorvência média dos duplicados dos padrões (eixo Y) em função da sua quantidade de fósforo (eixo X). A quantidade de fosfolípidos presente nos extratos lipídicos do soro foi determinada pela multiplicação da quantidade de fósforo por 25 (fator de conversão).

2.5 Análise e quantificação de ácidos gordos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)

A análise do perfil de FA do extrato lipídico de soro foi realizada através de GC-MS. Analisaram-se 8 extratos lipídicos de soro de cada grupo de BMI (controlo, excesso de peso e obesidade), sendo 4 amostras de indivíduos do sexo feminino e 4 do sexo masculino. Para a análise por GC-MS foi necessário derivatizar as amostras, recorrendo ao processo de transmetilação de FA. Os ácidos gordos metilados são voláteis, pelo que desta forma é possível a proceder à sua análise por GC-MS. O processo de transmetilação seguiu as linhas gerais da metodologia proposta pela União Internacional da Química Aplicada (IUPAC) (91). Este método baseia-se na adição de hidróxido de potássio em metanol de modo a promover a formação de ésteres metílicos de FA por transmetilação. Assim, transferiu-se 15 µL do extrato lipídico redissolvido em CHCl₃, correspondendo a 15 µg de fosfolípidos, para um tubo previamente lavado com *n*-hexano. Os tubos foram secos em corrente de azoto, seguindo-se a adição de 1 mL de padrão interno C19:0 (1 µg/mL) (*Sigma-Aldrich Chemical Co*, St. Louis, MO, EUA) em hexano e 200 µL de hidróxido de potássio (2M) em metanol. Agitou-se vigorosamente num vortéx durante 2 minutos e adicionou-se 2 mL de solução de NaCl (1g/100mL). De modo a promover a separação de fases, centrifugou-se a 2000 rpm durante 5 minutos. Recolheu-se a fase orgânica para um *eppendorf* previamente lavado com *n*-hexano, tendo o cuidado de não retirar mais de 600 µL de fase orgânica, de modo a evitar a transferência de sais, e secou-se em corrente de azoto.

Para análise por GC-MS, as amostras foram redissolvidas em 60 µL de *n*-hexano, tendo-se injetado 1 µL da solução resultante no cromatógrafo gasoso GCMS-QP2010 Ultra (*Shimadzu*, Quioto, Japão). O cromatógrafo estava equipado com um injetor automático e uma coluna DB-1 com 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura (*Agilent J&W*, Agilent Technologies, Santa Clara, EUA). Cada amostra foi injetada em modo *splitless* (razão de *split*: 2) a 250°C. O programa de temperaturas iniciou-se a 80°C, durante 3 minutos, seguindo-se um aumento de temperatura a uma taxa de 25 °C/minuto até aos 160°C. Seguiu-se novo aumento de temperatura a uma taxa de 2°C/minuto até aos 210°C e de 30°C/minuto até aos 250°C, tendo-se mantido a esta temperatura durante 10 minutos. O gás de arraste utilizado foi o hélio, a uma velocidade linear de 43,6 cm/s e a uma taxa de fluxo de 1,4 mL/minuto. A temperatura da fonte de iões e da interface foi 200°C e 250°C, respetivamente. O

espectrômetro de massa acoplado ao GC continha uma fonte de ionização de impacto eletrônico a operar a 70eV. Os espectros foram obtidos em modo *full scan* na gama de valores de m/z 35-700 em ciclos de 0,3 segundos. A identificação de FA foi realizada por comparação do tempo de retenção e dos espectros de massa com padrões comerciais de ácidos gordos metilesterificados (*Supelco 37 Component FAME Mix*) e pela confirmação através de comparação com espectros de massa da biblioteca “*The Lipid Web*” (92). A quantidade relativa de cada FA foi calculada pelo método de área percentual com normalização adequada, considerando a soma de todas as áreas dos FA identificados, sendo os resultados expressos em percentagem (%).

2.6 Análise e quantificação das classes de fosfolípidos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS)

A análise do perfil fosfolipídico das amostras de soro, de modo a identificar possíveis diferenças entre cada um dos grupos de BMI, foi realizada com recurso à técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (HPLC-MS, do inglês *high-performance liquid chromatography–mass spectrometry*). Os fosfolípidos foram separados através da cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC-LC/MS, do inglês *hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry*), utilizando uma coluna *Ascentis Si HPLC Pore* (15 cm x 1,0 mm, 3 μ m; *Sigma-Aldrich*) e um sistema HPLC (Ultimate 3000 Dionex, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) com injetor automático acoplado *online* ao espectrômetro de massa Q Exactive Orbitrap (*Thermo Fisher Scientific*, Bremen, Alemanha). O sistema de solventes foi composto por duas fases móveis: eluente A (50% ACN, 25% metanol e 25% H₂O com 1 mM de acetato de amónio) e eluente B (60% ACN e 40% metanol com 1 mM de acetato de amónio). Para a análise, a 79 μ L de sistema de solventes (60% eluente B e 40% eluente A), adicionou-se 5 μ L de amostra (correspondente a 5 μ g de fosfolípidos) e 4 μ L de cada padrão interno: PE (14:0/14:0) (0.02 μ g/100 μ L); SM (d18:1/17:0) (0.02 μ g/100 μ L); LPC (19:0) (0.02 μ g/100 μ L) e PG (14:0/14:0) (0.012 μ g/100 μ L). Uma alíquota de 5 μ L desta mistura foi introduzida na coluna *Ascentis Si HPLC Pore* (15 cm x 1,0 mm, 3 μ m; *Sigma-Aldrich*), mantida a 30°C. O caudal foi ajustado para 40 μ L/min e o gradiente de solvente utilizado foi programado da seguinte forma: 40% de eluente A durante 8 minutos, seguiu-se um aumento linear para 60% de eluente A, durante 7 minutos, no qual se manteve durante 5 minutos até retornar às condições iniciais em 5

minutos seguido de um período de 10 minutos para restabelecer o equilíbrio antes da injeção seguinte. A análise dos fosfolípidos foi realizada num espectrômetro de massa do tipo *Q exactive orbitrap* com uma fonte de ionização de *eletrospray* aquecida (HESI, do inglês *heated electrospray ionization*) no modo positivo (voltagem de 3kV) e no modo negativo (voltagem de -2,7 kV). A taxa de fluxo de gás foi mantida a 15 unidades, a temperatura capilar foi de 250 °C, o potencial das S-lentes RF foi igual a 50 unidades e a temperatura da sonda aquecida igual a 100°C. Para a aquisição dos espectros de massa definiu-se um método dependente dos dados (do inglês, *data-dependent*). O método de aquisição foi em *full scan* na gama de valores de m/z 200-1600, resolução de 70000, controlo automático de ganho 1×10^6 e 2 *microscans*. Os 10 iões mais intensos foram selecionados para fragmentação na célula de colisões HCD. A energia de colisão variou entre 25, 30 e 35 eV. Os espectros de massa *tandem* (espectros de MS/MS) foram adquiridos com uma resolução de 17500, ganho automático de controlo 1×10^5 , 1 *microscan* e janela de isolamento de m/z 1. O limite para a seleção de iões foi 2×10^4 contagens. O máximo de iões acumulados permitidos foi 100 ms para os espectros de MS e 50 ms para os espectros de MS/MS. A exclusão dinâmica foi definida para os 60 s. De modo a identificar o perfil em classes de fosfolípidos de cada condição experimental, os espectros adquiridos foram analisados com recurso ao programa de análise de dados *Xcalibur v3.3* (Thermo Fisher Scientific, EUA). A identificação foi realizada com recurso à massa exata das espécies lipídicas, ao seu tempo de retenção e à interpretação dos espectros de MS/MS. Após identificação, a quantificação das espécies moleculares foi realizada com recurso à integração da área dos picos do cromatograma. Os espectros de massa foram processados e integrados no programa *MZmine v2.30* (93).

2.7 Análise estatística

Os resultados experimentais são apresentados em termos de média \pm desvio. As diferenças existentes entre as condições experimentais relativas aos FA analisados por GC-MS foram estudadas com recurso à análise de variância com um fator (One-way ANOVA, do inglês *analysis of variance*) combinada com o teste de comparação múltipla de Bonferroni. Esta análise foi realizada com recurso ao *software* PRISM GraphPad, Inc v 6 para o *Windows*. Os dados de HPLC-MS e MS/MS foram estatisticamente analisados pela análise de componentes principais (PCA, do inglês *principal component analysis*) e por Mínimos Quadrados Parciais- Análise Discriminante (PLS-DA, do inglês *Partial*

Least Square-Discriminant Analysis), através de dados *auto scaled*, utilizando o *software* R versão 3.4.2. Para analisar a normalidade dos dados foi utilizado o teste Shapiro-Wilk. A análise estatística univariada foi realizada com recurso ao teste ANOVA combinada com o teste *post-hoc* LSD. Considerou-se o valor $p < 0,05$ como um indicador de significância estatística. Esta análise foi realizada com recurso ao *software* IBM SPSS versão 24.0.

3 Caracterização do perfil fosfolipídico de crianças com excesso de peso e obesidade

3.1 Caracterização da amostra

As crianças, com idades compreendidas entre os 8 e 17 anos, foram recrutadas no Centro Hospitalar do Baixo Vouga onde lhes foi medido o peso e a altura e calculado o BMI de modo a dividi-las em 3 grupos distintos: crianças com peso normal, crianças com excesso de peso (EP) e crianças com obesidade (OB).

Deste modo, foram selecionadas 32 crianças: 8 com peso normal (4 do sexo feminino e 4 do sexo masculino), 14 com excesso de peso (5 do sexo feminino e 4 do sexo masculino) e 10 com obesidade (5 do sexo feminino e 5 do sexo masculino). As crianças com peso normal apresentavam BMI entre 19,4 e 23,0 kg/m², com média de 21,7 kg/m², sendo consideradas como grupo controlo. As crianças com excesso de peso apresentavam BMI entre 25,3 e 28,5 kg/m², com média de 27,2 kg/m². Por fim, as crianças com obesidade apresentavam BMI entre 30,7 e 38,3 kg/m², com média de 33,5 kg/m² (Tabela 9).

Tabela 9- Caracterização das crianças com peso normal, excesso de peso e obesidade em termos de sexo, idade, BMI e percentil de BMI. Os valores médios de BMI estão apresentados como média \pm desvio-padrão.

	Sexo	Idade	BMI (kg/m ²)	Percentil do BMI
Peso Normal	F	8	22,7	5 a 85
	F	13	19,4	
	F	15	22,1	
	F	17	20,5	
	M	13	21,4	
	M	15	22,7	
	M	15	21,5	
	M	15	23,0	
Média \pm DP			21,7 \pm 1,17	
Excesso de Peso	F	8	27,9	85 a <95
	F	9	27,0	
	F	12	26,4	
	F	12	25,3	
	F	17	27,8	
	M	8	27,1	
	M	10	26,9	

	M	11	27,7	
	M	12	27,5	
	M	12	28,5	
	M	12	28,5	
	M	14	26,9	
	M	14	26,8	
	M	16	25,8	
Média±DP			27,2±0,89	
Obesidade	F	10	34,3	>95
	F	15	31,6	
	F	16	33,3	
	F	17	38,3	
	F	17	30,7	
	M	13	33,0	
	M	13	32,9	
	M	15	31,6	
	M	16	34,9	
	M	16	34,9	
Média±DP			33,5±2,08	

F – Feminino; M – Masculino; BMI – índice de massa corporal

3.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

O soro das crianças selecionadas foi recolhido pelo Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, onde foram analisados os seguintes parâmetros bioquímicos: glucose, insulina, aminotransferases (AST e ALT), hemoglobina A1c, colesterol total, HDL, LDL, TG e a hormona da tiroide (TSH, do inglês *thyroid-stimulating hormone*). Os parâmetros referidos foram avaliados tendo em conta os valores de referência presentes na Tabela 10, de modo a excluir a presença de outras patologias.

Tabela 10- Valores de referência pediátricos para os parâmetros avaliados. Adaptado de (94).

Parâmetro	Valores de Referência	
	Feminino	Masculino
Glucose	70-140 mg/dL	
Insulina	3-25 mUI/L	
AST	8-50 U/L (1-13 anos)	8-60 U/L (1-13 anos)
	8-43 U/L (≥ 14 anos)	8-48 U/L (≥ 14 anos)
ALT	7-45 U/L	7-55 U/L
HbA1c	< 8% (6-12 anos)	
	< 7,5% (13-19 anos)	

Colesterol total	Desejável: < 200 mg/dL Aceitável: 200-239 mg/dL Alto: ≥ 240 mg/dL
HDL	Desejável: > 45 mg/dL Aceitável: 40-45 mg/dL Baixo: ≤ 40 mg/dL
LDL	Desejável: ≤ 110 mg/dL Aceitável: 100-129 mg/dL Alto: ≥ 130 mg/dL
TG	(2-9 anos) Desejável: < 75 mg/dL Alto: ≥ 100 mg/dL (10-17 anos) Desejável: < 90 mg/dL Alto: ≥ 130 mg/dL
TSH	0,6-4,8 mU/L (6-10 anos) 0,5-4,3 mU/L (11-19 anos)

Os resultados da avaliação dos parâmetros bioquímicos mencionados encontram-se representados na Tabela 11. As crianças de peso normal apresentavam valores normais na maioria dos parâmetros bioquímico, com exceção de 3 crianças, 2 do sexo feminino e 1 do sexo masculino, que apresentavam alguns parâmetros na gama do aceitável (parâmetros bioquímicos: HDL e LDL) ou fora do intervalo de referência (parâmetros bioquímicos: HDL, TG e TSH). Relativamente às crianças com excesso de peso, estas apresentavam valores normais de AST, ALT, HbA1c e TSH. No entanto algumas crianças apresentavam valores de colesterol total (n=2), HDL (n=4), LDL (n=4) e TG (n=1) na gama do aceitável e de glucose (n=1), insulina (n=2), LDL (n=2) e TG (n=1) fora do intervalo de referência. Por sua vez, as crianças com obesidade apresentavam valores normais de glucose, AST, ALT, HbA1c e TSH. No entanto algumas crianças deste grupo apresentavam os parâmetros bioquímicos colesterol total (n=1), HDL (n=2), LDL (n=1) e TG (n=4) na gama dos valores aceitáveis, enquanto os parâmetros insulina (n=4), HDL (n=3) e LDL (n=5) de algumas crianças encontravam-se fora dos valores de referência.

Caracterização do perfil fosfolipídico de crianças com excesso de peso e obesidade

Tabela 11- Parâmetros bioquímicos das crianças selecionadas. Os valores a sublinhado encontram-se na gama dos valores aceitáveis e os valores a **negrito e sublinhado** encontram-se fora do intervalo de referência.

	Sexo/ Idade	Glucose (mg/dL)	Insulina (mUI/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	HbA1c (%)	Colesterol total (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	TG (mg/dL)	TSH (mU/L)
Peso Normal	F/8	99	21	38	34	5	158	<u>41</u>	102	<u>116</u>	<u>5,0</u>
	F/13	95	13,5	22	21	4,1	180	<u>43,4</u>	<u>112,6</u>	<u>204</u>	1,4
	F/15	86	19,3	16	13	4,8	166	71,5	89,9	<u>122</u>	2,5
	F/17	89	12,7	17	11	5	166	64	91	38	2,8
	M/13	85	8	31	25	4,9	118	58,6	50,5	34	1,3
	M/15	70	15,3	20	13	4,8	146	57	78,5	67	3,5
	M/15	87	7,7	18	11	5,1	160	52,5	98	53	1,3
	M/15	79	22,5	27	17	5,5	113	<u>36</u>	64	51	1,3
Excesso de Peso	F/8	87	8,5	39	31	4,9	170	53,8	103	74	3,5
	F/9	94	<u>29,8</u>	19	18	5,5	<u>218</u>	46,6	<u>155</u>	<u>109</u>	3,1
	F/12	84	16,2	18	15	5,2	155	<u>40,5</u>	101	<u>110</u>	2,0
	F/12	91	19,7	21	18	5,0	<u>205</u>	62,8	<u>133</u>	74	3,0
	F/17	80	11,5	20	28	5,2	184	68,5	100	87	1,6
	M/8	91	11,4	24	18	5,6	183	51	<u>123</u>	75	2,7
	M/10	83	8,2	21	11	5,3	146	55,1	80	55	1,2
	M/11	94	14,7	26	22	4,9	171	46,2	<u>111</u>	<u>93</u>	3,3
	M/12	94	13,2	38	38	5,6	158	<u>41,8</u>	<u>113</u>	61	2,0
	M/12	97	19,5	21	17	5,2	186	45,6	<u>126</u>	87	2,3
	M/12	90	<u>28,6</u>	24	30	5,3	166	45	110	72	1,7
	M/14	83	16	32	19	5,7	121	<u>40,5</u>	71	37	1,1
	M/14	98	9,8	22	18	5,7	122	<u>40,2</u>	69	52	2,0
	M/16	<u>53</u>	11,5	25	17	5,0	134	49,22	77	47	2,3
Obesidade	F/10	85	<u>45,4</u>	30	43	5,2	193	<u>43,6</u>	<u>140</u>	<u>114</u>	3,7
	F/15	89	24,3	24	24	5,5	155	49,8	99	53	3,0
	F/16	96	16,2	15	11	5	<u>209</u>	56,9	<u>133</u>	<u>113</u>	2,0
	F/17	106	<u>36,3</u>	43	27	5,6	141	<u>41,6</u>	88	<u>105</u>	2,2
	F/17	79	21,5	21	24	5	189	49,7	<u>130</u>	53	1,4
	M/13	93	23,8	24	19	5,1	132	50,1	66	70	2,0
	M/13	95	11,5	28	19	5,6	179	<u>35,4</u>	<u>136</u>	71	1,7
	M/15	94	11,6	23	16	4,8	185	50	94	61	2,5
	M/16	93	<u>29,2</u>	18	21	5,2	189	<u>33,5</u>	<u>145</u>	<u>101</u>	3,2
	M/16	102	<u>37,1</u>	23	38	5,5	161	<u>33,7</u>	<u>114</u>	82	2,6

F – Feminino; M – Masculino; AST – Aspartato aminotransferase; ALT – Alanina aminotransferase; HbA1c – Hemoglobina glicada; HDL – lipoproteína de elevada densidade; LDL – lipoproteína de baixa densidade; TG – triglicerídeos; TSH – hormona estimuladora da tiroide

3.3 Análise do perfil de ácidos gordos dos fosfolípidos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)

O perfil de FA presentes nos extratos fosfolipídicos foi analisado com recurso à identificação de ésteres metílicos de FA por GC-MS. Através da integração dos picos dos cromatogramas de GC-MS foi possível proceder a uma quantificação relativa de cada FA, tendo sido considerados os FA com uma abundância relativa superior a 1%. A análise dos cromatogramas e dos espectros de massa permitiu identificar o ácido palmítico (C16:0), o ácido esteárico (C18:0), o ácido oleico (C18:1), o ácido linoleico *n*-6 (C18:2), o ácido araquidónico *n*-6 (C20:4), o ácido homo- γ -linolénico *n*-6 (C20:3) e o ácido docosahexanóico *n*-3 (22:6). Em todas as condições os FA mais abundantes foram: C16:0 e C18:0.

Para cada condição, isto é, para crianças de peso normal, excesso de peso e obesidade, foram avaliadas as alterações no perfil de FA. Esta análise permitiu identificar diferenças significativas entre o perfil de ácido palmítico (C16:0), ácido linoleico (C18:2 *n*-6) e ácido esteárico (C18:0) de crianças de peso normal em comparação com as crianças com excesso de peso (Figura 6). Assim, verificou-se um aumento na abundância relativa do ácido palmítico (C16:0) e do ácido esteárico (C18:0) e uma diminuição na abundância relativa do ácido linoleico (C18:2 *n*-6) em crianças com excesso de peso comparativamente ao grupo controlo. A abundância relativa do ácido linoleico (C18:2 *n*-6) e do ácido esteárico (C18:0) é, também, diferente entre crianças de peso normal e crianças obesas, observando-se uma diminuição da abundância relativa do ácido linoleico e um aumento da abundância relativa do ácido esteárico em crianças obesas. No entanto, não se verificaram diferenças entre o perfil de ácidos gordos de crianças com excesso de peso em comparação com as crianças com obesidade (Figura 6). Em resumo, em ambos os grupos, excesso de peso e obesidade, observou-se uma diminuição do ácido linoleico (C18:2 *n*-6) e um aumento de FA saturados. Foi, ainda, avaliado o perfil de FA de crianças do sexo feminino e do sexo masculino em cada condição, não tendo sido observadas diferenças significativas entre os dois sexos (Figura 7).

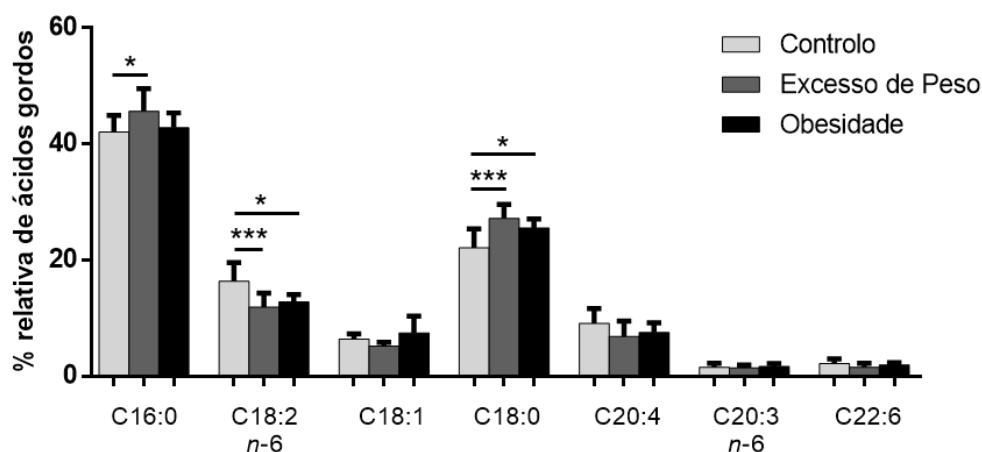


Figura 7- Composição de ácidos gordos dos extratos fosfolipídicos provenientes do soro de crianças com peso normal (controlo), excesso de peso e obesidade. O perfil de ácidos gordos foi obtido recorrendo a análise por GC-MS. Os resultados encontram-se representados em termos de média±desvio padrão de 8 réplicas biológicas para cada condição (n=8). * p<0,05; ***p<0,001 (ANOVA *Bonferroni's Multiple Comparison Test*).

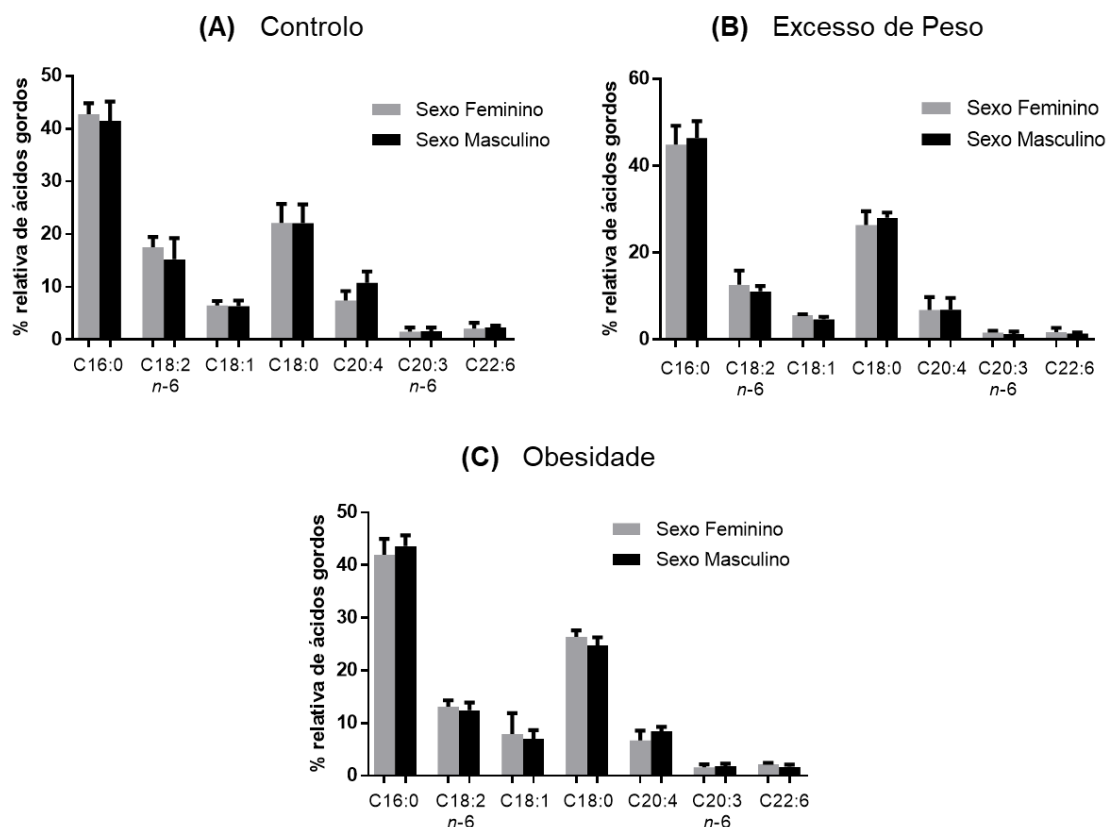


Figura 6- Composição de ácidos gordos presentes nos fosfolípidos de amostras de soro de crianças do sexo feminino e do sexo masculino com peso normal (A), excesso de peso (B) e obesidade (C). O perfil de ácidos gordos foi obtido através de análise por GC-MS. Os resultados encontram-se representados em termos de média±desvio padrão de 4 réplicas biológicas para cada condição (n=4).

3.4 Análise do perfil de fosfolípidos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa tandem (HPLC-MS/MS)

O perfil fosfolipídico do soro de crianças com diferentes BMI foi analisado por HPLC-MS e MS/MS, permitindo determinar alterações a nível molecular de cada classe de fosfolípidos. No modo positivo foram analisadas as classes PC, LPC, SM e PE, enquanto no modo negativo analisaram-se as classes PG, PS, PI e PE. Os cromatogramas e espectros de HPLC-MS e MS/MS foram analisados com recurso ao *software Xcalibur v3.3* e a integração foi realizada no *software MZmine v.2.30*, tendo-se realizado a confirmação por interpretação manual dos dados. As classes de fosfolípidos presentes nas amostras apresentam diferentes tempos de retenção, pelo que a sua separação é visível nos cromatogramas. Como representado no cromatograma da Figura 8, as classes das PG, PI e PS eluem entre os 2-3 minutos, a classe das PE elui entre os 3-5 minutos, a classe das PC elui entre os 8-10 minutos, a classe das SM elui entre os 10-12 minutos e, finalmente, a classe das LPC elui entre os 13-16 minutos.

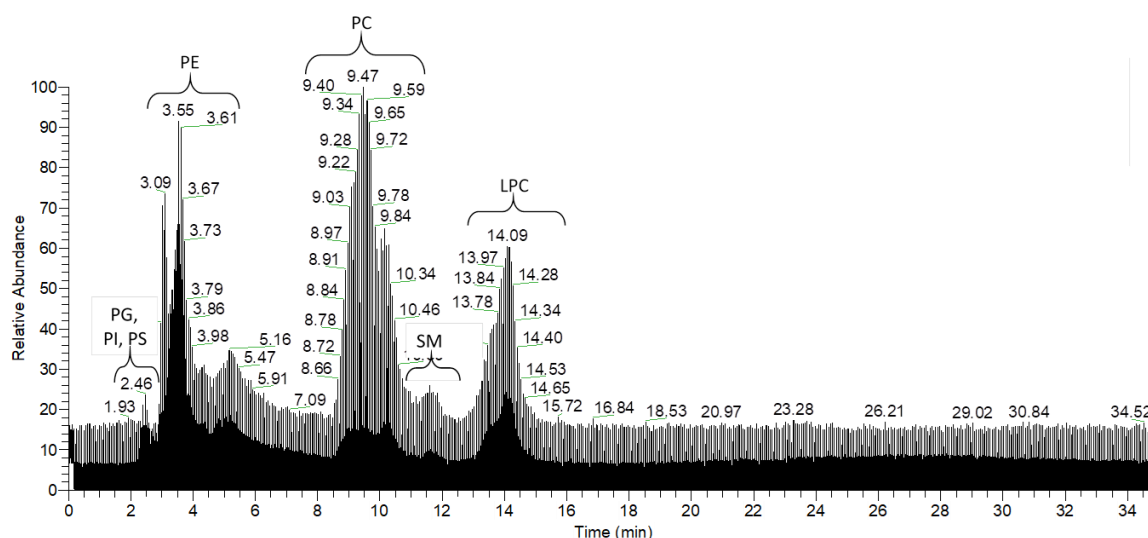


Figura 8- Exemplo de cromatograma obtido por HPLC-MS com a separação das classes fosfolipídicas presentes nas amostras de soro de crianças. As classes das PG, PI e PS eluem entre os 2-3 minutos, a das PE entre os 3-5 minutos, a das PC entre os 8-10 minutos, a das SM entre os 10-12 minutos e a classe das LPC elui entre os 13-16 minutos.

Esta abordagem lipidómica baseada em espectrometria de massa permitiu identificar um total de 166 espécies fosfolipídicas nas amostras de soro de crianças, nomeadamente 66 espécies moleculares de PC, 27 espécies de LPC, 18 espécies moleculares de SM e 41 espécies moleculares de PE. A PG, PI e PS foram as classes que apresentaram menor número de espécies identificadas com 1, 11 e 2 espécies moleculares, respetivamente. As espécies moleculares identificadas estão apresentadas no Anexo A.

A classe de fosfolípidos mais abundantes é a das PC, tendo as espécies desta classe sido identificadas nos espectros de MS no modo positivo como iões $[M+H]^+$. A espécie molecular mais abundante desta classe, em todos os grupos, foi a PC (34:2) de m/z 758,57, identificada por MS/MS como PC (16:0/18:2), seguida pela PC (36:4) de m/z 782,57, identificada por MS/MS como PC (16:0/20:4), e pela PC (36:2) de m/z 786,60, identificada por MS/MS como PC (18:0/18:2), (Figura 9A). Nos espectros MS/MS das PC, no modo positivo, é possível observar o ião característico da cabeça polar, de m/z 184,1 correspondente à colina e ao grupo fosfato, bem como as perdas neutras dos FA na forma de RCOOH, como representado na Figura 9B. No entanto, por vezes foi necessário recorrer ao espectro de MS/MS das PC como iões $[M+CH_3COO]^-$ (modo negativo) para identificar os FA presentes nas espécies moleculares. Nos espectros de MS/MS dos iões $[M+CH_3COO]^-$ das PC é possível observar os iões carboxilato de cada ácido gordo ($RCOO^-$), o que permite identificar a sua composição em cadeia acilo.

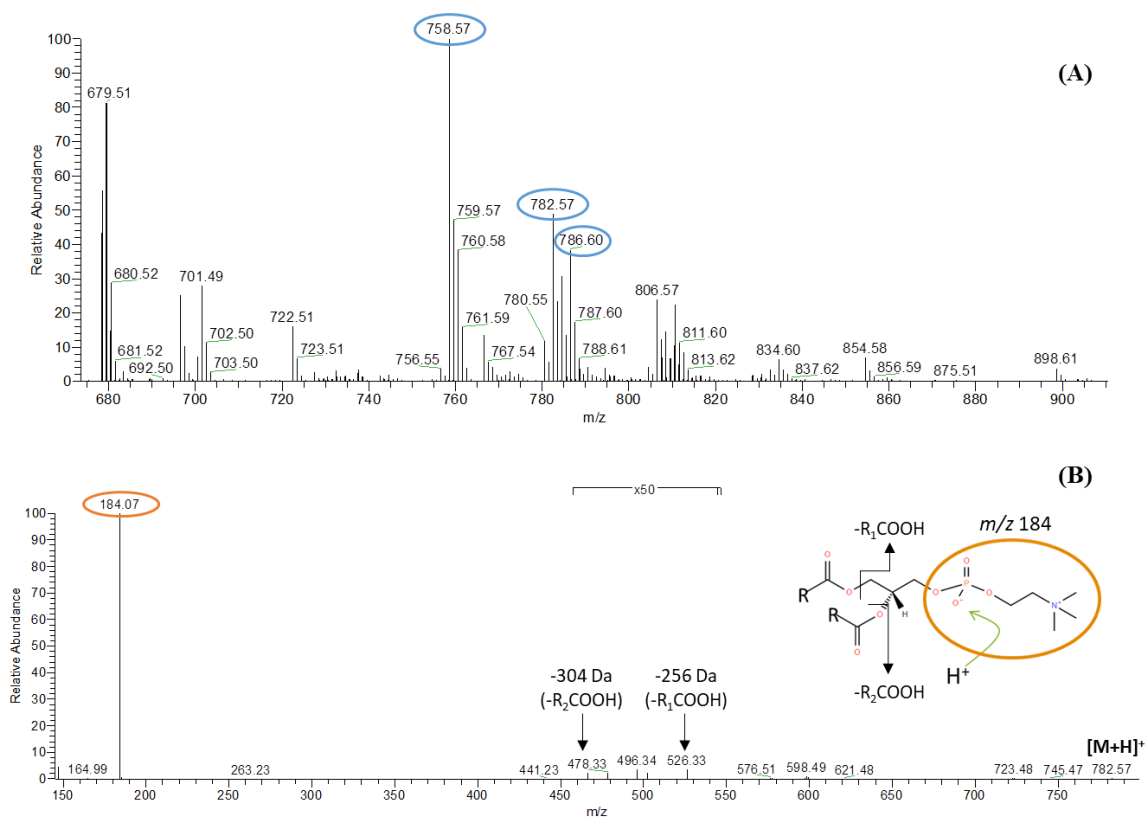


Figura 9- (A) Espectro de HPLC-MS, no modo positivo, no tempo de retenção 8-10 minutos, onde eluem as PC. Os valores de m/z correspondentes às espécies moleculares de PC mais abundantes estão assinaladas com uma circunferência. (B) Exemplo de espectro de HPLC-MS/MS do ião $[M+H]^+$ da PC (36:4), de m/z 782,57, identificada como PC (16:0/20:4). Neste espectro, pode observar-se o ião fragmento característico da cabeça polar da fosfocolina (colina e grupo fosfato), de m/z 184,1 e, também, os iões fragmento resultantes das perdas neutras de -256 Da e -304 Da, correspondentes às perdas dos ácidos gordos C16:0 e C20:4, respetivamente.

A classe das LPC foi observada e identificada nos espectros HPLC-MS e MS/MS no modo positivo como iões $[M+H]^+$. Desta classe, as espécies mais abundantes foram a LPC (16:0) de m/z 496,34, a LPC (18:2) de m/z 520,34 e a LPC (18:0) de m/z 524,37 (Figura 10A). À semelhança das PC, no espectro MS/MS das LPC observa-se o ião característico da cabeça polar de m/z 184,1 e a perda neutra do FA na forma RCOOH, como representado na Figura 10B.

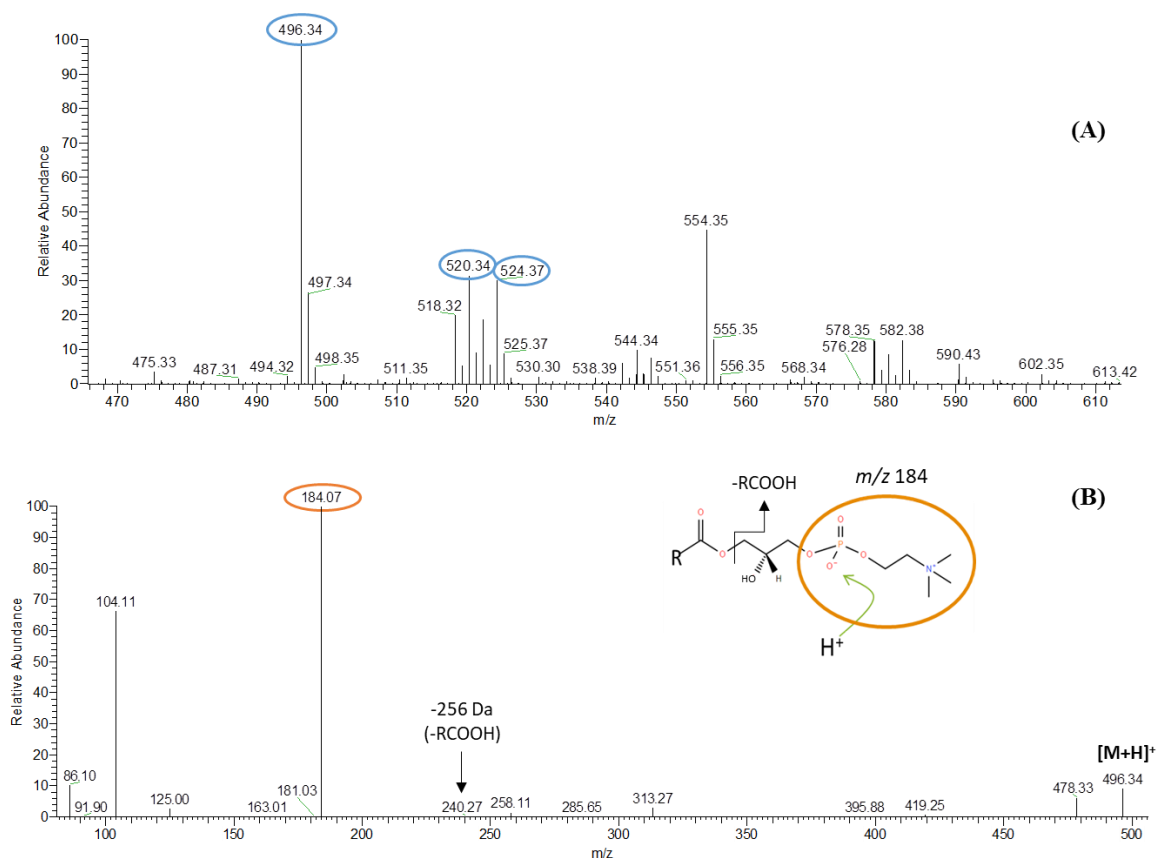


Figura 10-(A) Espectro de HPLC-MS, no modo positivo, no tempo de retenção 13-16 minutos, onde eluem as LPC. Os valores de m/z correspondentes às espécies moleculares de LPC mais abundantes estão assinaladas com uma circunferência. **(B)** Exemplo de espectro de HPLC-MS/MS do ião $[M+H]^+$ da LPC (16:0), de m/z 496,34, com o ião fragmento característico da cabeça polar (colina e grupo fosfato), de m/z 184,1 e com a perda neutra de -256 Da correspondente à perda de RCOOH do ácido gordo C16:0.

A classe das SM foi observada e identificada nos espectros HPLC-MS e MS/MS no modo positivo como iões $[M+H]^+$. A SM (d34:1, SM d18:1/16:0) de m/z 703,58 revelou ser a espécie mais abundante, seguida pela SM (d34:2) de m/z 701,56 e pela SM (d36:2) de m/z 729,59 (Figura 11A). No espectro MS/MS das SM é visível o ião que corresponde à cabeça polar constituída por colina e pelo grupo fosfato, de m/z 184,1. Por vezes é, também visível o ião que corresponde à ceramida após a perda de uma molécula de água, representado por ceramida-2H₂O. Adicionalmente, neste espectro de MS/MS é possível observar o ião fragmento de m/z 264,3, característico da esfingosina d18:1 e que

corresponde ao ião na forma de $[d18:1-2H_2O+H]^+$ (Figura 11B).

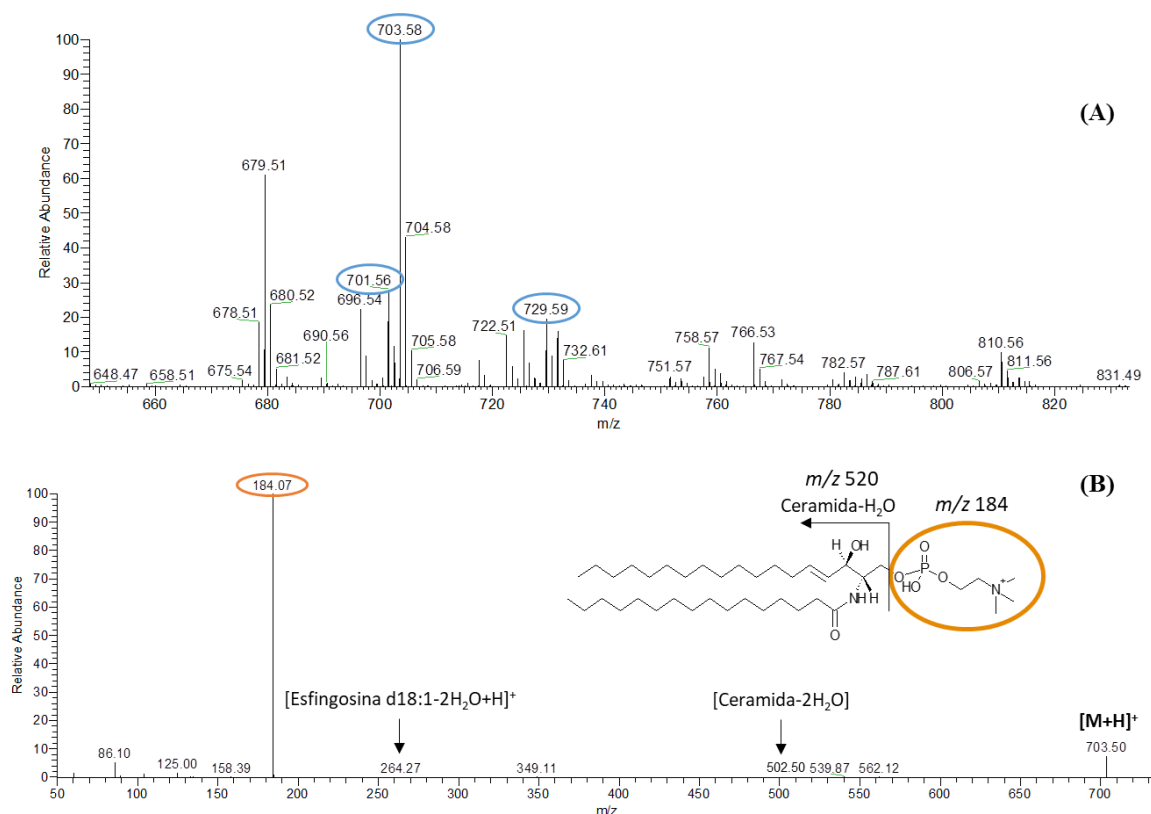


Figura 11- (A) Espectro de HPLC-MS, no modo positivo, no tempo de retenção 10-12 minutos, onde eluem as SM. Os valores de m/z correspondentes às espécies moleculares de SM mais abundantes estão assinaladas com uma circunferência. (B) Exemplo de espectro de HPLC-MS/MS do ião $[M+H]^+$ da SM (d34:1, SM d18:1/16:0) de m/z 703,50, com o ião fragmento característico da cabeça polar (colina e grupo fosfato), de m/z 184,1, bem como a perda neutra de colina e H_2O , representado pelo ião de m/z 502,5 e o ião correspondente à esfingosina- $2H_2O$, de m/z 264,3.

A classe das PE foi observada e identificada nos espectros HPLC-MS e MS/MS no modo positivo como iões $[M+H]^+$. No modo positivo, as espécies com sinal maior desta classe foram a PE (O-38:6/P-38:5) de m/z 750,54, a PE (O-38:5/P-38:4) de m/z 752,56 e a PE (30:3) de m/z 658,51 (Figura 12A). No espectro MS/MS das PE como iões $[M+H]^+$, é visível a perda de 141 Da correspondente à cabeça polar constituída pela etanolamina e pelo grupo fosfato. São, ainda, visíveis os FA na forma de ião $[RCO]^+$, como representado na Figura 12B.

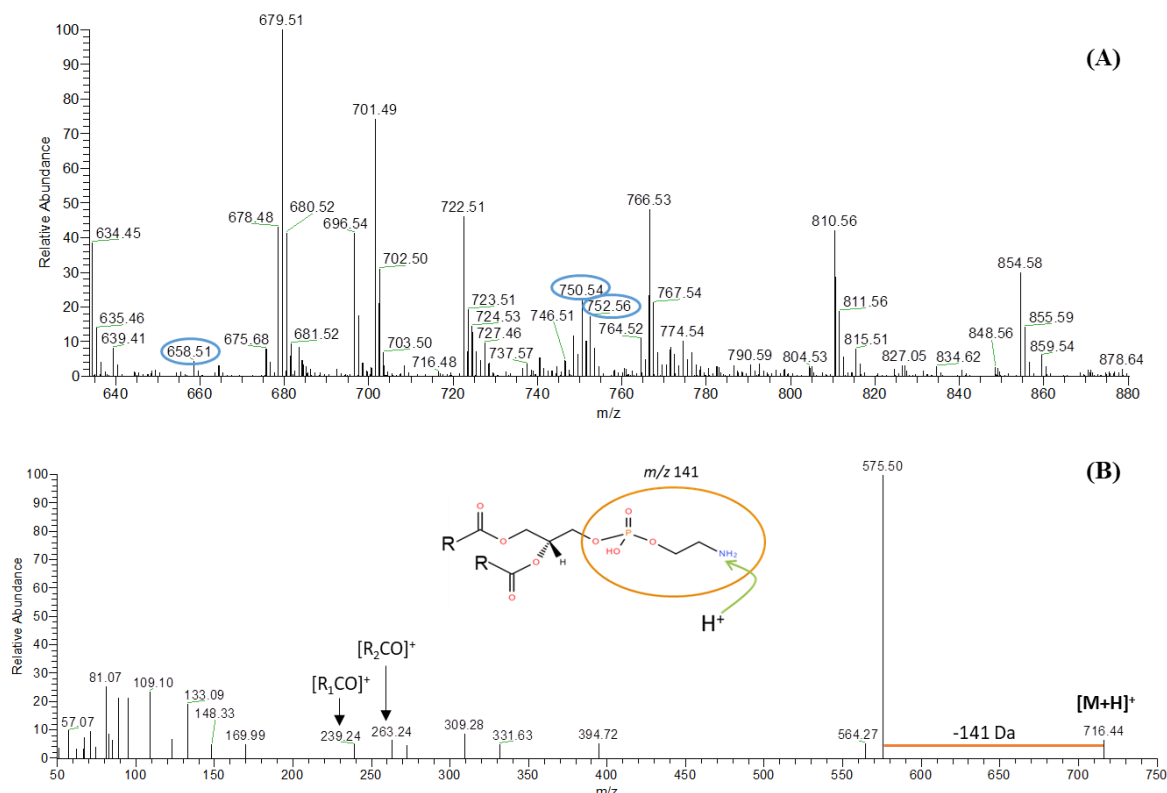


Figura 12- (A) Espetro de HPLC-MS, no modo positivo, no tempo de retenção 3-5 minutos, onde eluem as PE. Os valores de m/z correspondentes às espécies moleculares de PE com maior sinal estão assinaladas com uma circunferência. (B) Exemplo de espectro de HPLC-MS/MS do ião $[M+H]^+$ da PE (34:2) de m/z 716,44, em que se pode observar a perda neutra de 141 Da característica da cabeça polar das PE (etanolamina e grupo fosfato) e, também, os iões de m/z 239,2 e m/z 263,2 correspondentes aos ácidos gordos C16:0 e C18:2, respetivamente, na forma de $[RCO]^+$.

A classe das PE foi, também, observada e identificada nos espectros HPLC-MS e MS/MS no modo negativo como iões $[M-H]^-$. No modo negativo, as espécies que apresentaram maior sinal desta classe foram a PE (O-38:6/P-38:5) de m/z 748,53, a PE (O-38:5/P-38:4) de m/z 750,54 e a PE (O-36:5/P-36:4) de m/z 722,51 (Figura 13A). No espectro MS/MS, no modo negativo, é visível o ião fragmento que corresponde à cabeça polar constituída por etanolamina e pelo grupo fosfato, de m/z 140 Da, bem como os FA correspondentes a cada espécie molecular na forma de ião $[RCOO]^-$ (Figura 13B).

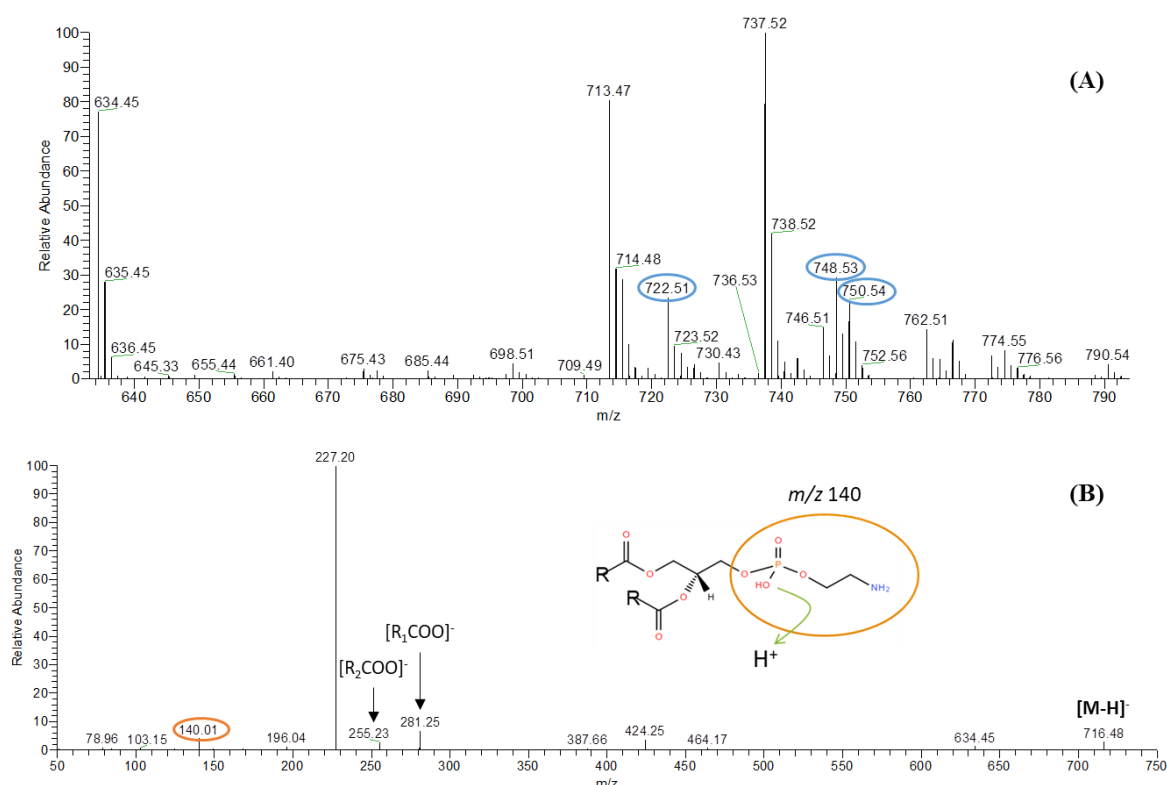


Figura 13- (A) Espectro de HPLC-MS, no modo negativo, no tempo de retenção 3-5 minutos, onde eluem as PE. Os valores de m/z correspondentes às espécies moleculares de PE com maior sinal estão assinaladas com uma circunferência. (B) Exemplo de espectro de HPLC-MS/MS do ião $[M-H]^-$ da PE (34:1) de m/z 716, 52, com o ião correspondente à cabeça polar (etanolamina e grupo fosfato) de m/z 140 e com os iões correspondentes aos ácidos gordos C16:0 e C18:1 na forma de $[RCOO]^-$ de m/z 255 e m/z 281, respetivamente.

As classes com menor número de espécies moleculares identificadas foram PG, PS e PI, identificadas no modo negativo como iões $[M-H]^-$. Em relação à classe das PG apenas se identificou a PG (38:7) de m/z 791,48, que apresenta uma abundância reduzida, e a PG (28:0) de m/z 665, 4 que corresponde ao padrão interno adicionado (Figura 14 A). No espectro MS/MS desta classe seria visível o ião fragmento característico da cabeça polar constituída por glicerol e pelo grupo fosfato, de m/z 171,0, bem como os iões correspondentes aos FA na forma de $[RCOO]^-$. Na classe das PS apenas se identificaram 2 espécies moleculares: a PS (30:2) de m/z 702,43 e a PS (48:12) de m/z 934,56 (Figura 14 B). No espectro MS/MS desta classe seria visível a perda de 87 Da, correspondente à serina, bem como os iões correspondentes aos FA na forma de $[RCOO]^-$. No entanto, dado a reduzida abundância das PG e PS identificadas, não foi possível obter o espectro MS/MS das espécies moleculares, pelo que identificação foi baseada apenas com recurso ao tempo de retenção característico e à massa exata.

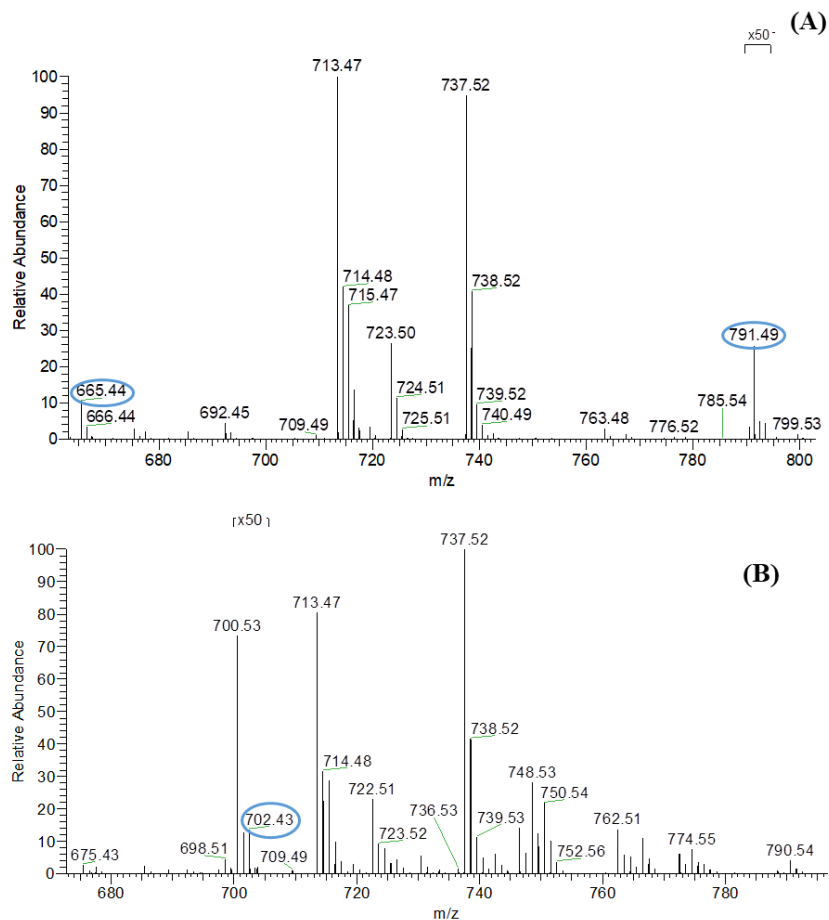


Figura 14- (A) Espetro de HPLC-MS, no modo negativo, no tempo de retenção 2-3 minutos, onde eluem as PG. Os valores de m/z correspondentes às espécies moleculares de PG identificadas estão assinaladas com uma circunferência. (B) Espetro de HPLC-MS, no modo negativo, no tempo de retenção de 2-3 minutos, onde eluem as PS. Os valores de m/z correspondente a uma das espécies moleculares identificada está assinalada com uma circunferência.

Por fim, as espécies mais abundantes da classe das PI foram a PI (38:4) de m/z 885,55 e a PI (42:0) de m/z 949,67 (Figura 15A). No espectro de MS/MS do ião $[M-H]^-$ é visível o ião fragmento característico da cabeça polar constituída por inositol e pelo grupo fosfato, de m/z 241,0, bem como os iões correspondentes aos FA na forma de $[RCOO]^-$ (Figura 15B).

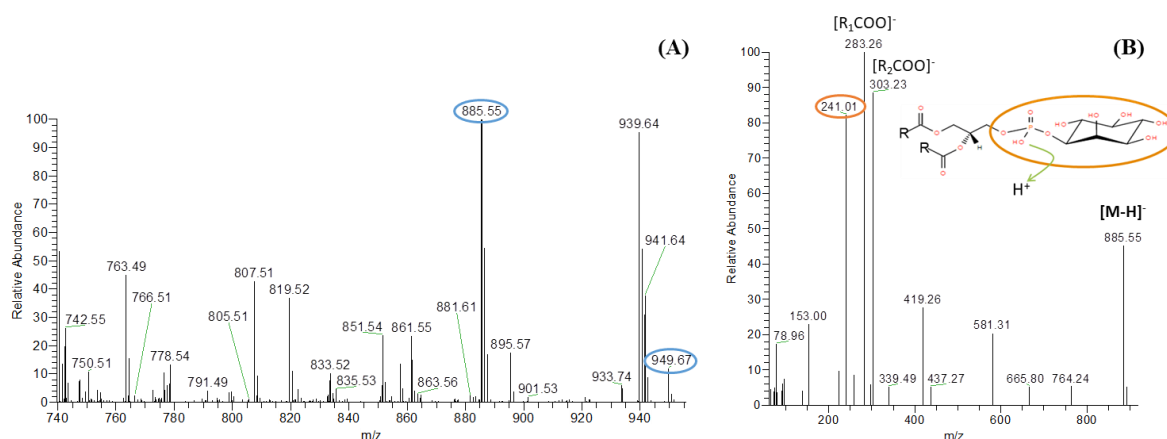


Figura 15- (A) Espetro de HPLC-MS, no modo negativo, no tempo de retenção 2-3 minutos, onde eluem as PI. Os valores de m/z correspondentes às espécies moleculares de PI mais abundantes estão assinaladas com uma circunferência. (B) Exemplo de espectro de HPLC-MS/MS do ião $[M-H]^-$ da PI (38:4) de m/z 885,55, com o ião correspondente à cabeça polar (inositol e grupo fosfato) de m/z 241 e com os iões correspondentes aos ácidos gordos C18:0 e C20:4 na forma de $[RCOO]^-$ de m/z 283 e m/z 303, respetivamente.

Com o intuito de identificar diferenças significativas nas espécies moleculares de fosfolípidos foi realizada uma análise estatística. Através da análise de componentes principais (PCA), realizada após integração das áreas dos picos das 166 espécies de fosfolípidos identificadas, foi possível discriminar visualmente o grupo das crianças controlo dos grupos de crianças com excesso de peso e com obesidade, tanto no modo positivo como no negativo (Figura 16A e 16B). No entanto, esta análise estatística não permitiu observar uma discriminação entre o grupo de crianças com excesso de peso e o grupo de crianças com obesidade. Tanto no modo positivo como no modo negativo, as crianças controlo foram diferenciadas das crianças com BMI elevado ao longo da primeira componente que representava no modo positivo 47,6% (modo positivo) e 56,7% (modo negativo) de variância geral. As principais espécies moleculares de fosfolípidos que contribuíram para a separação ao longo da componente 1 foram a PC (38:7) e a PE (36:4) no modo positivo, enquanto no modo negativo foram a PS 48:12 e a PE (O-38:7/P-38:6).

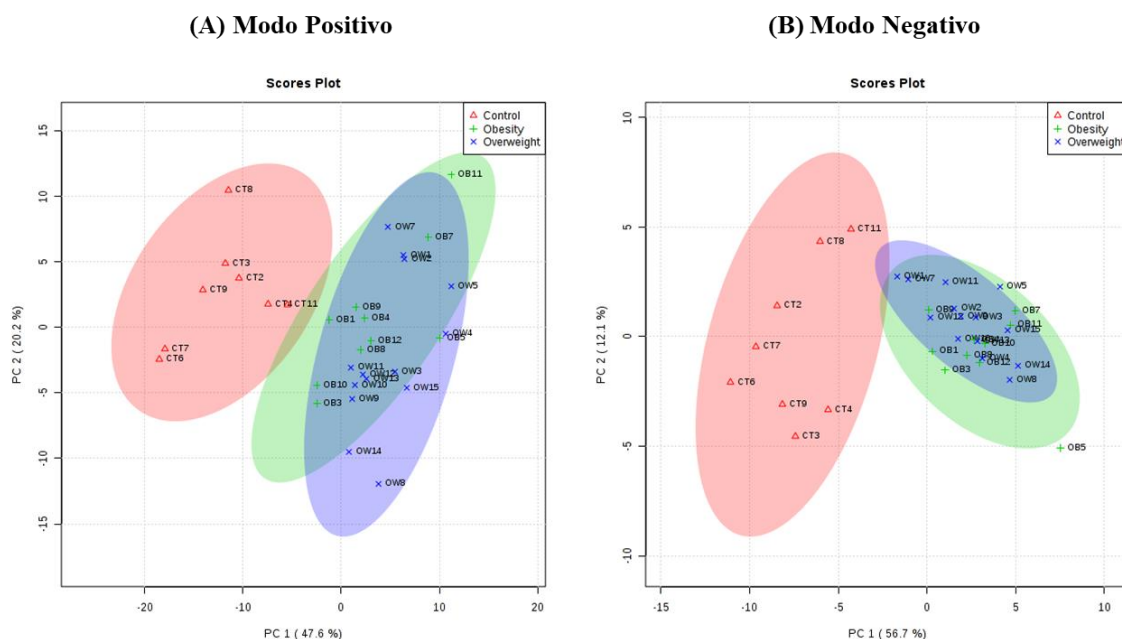


Figura 16- Análise de componentes principais (PCA) com as 166 espécies de fosfolípidos identificadas. (A) modo positivo onde a componente principal representa 47,6% de variância geral. (B) modo negativo onde a componente principal representa 56,7% de variância geral

De modo a identificar as espécies moleculares de fosfolípidos com a abundância relativa mais significativa para a diferenciação dos grupos experimentais, foi utilizado o método de Mínimos Quadrados Parciais- Análise Discriminante (PLS-DA) (Figura 17) e foi gerada uma Importância Variável na Projeção (VIP, do inglês Variable Importance in the Projection) (Figura 18). Através do método PLS-DA, aquando a análise dos fosfolípidos no modo positivo, foi possível discriminar as crianças controlo das crianças com excesso de peso e com obesidade, sendo a variância total 65,6% (componente 1 46,4% e componente 2 19,2%) (Figura 17 A). Por PLS-DA não foi possível observar uma discriminação entre o grupo de crianças obesas e o grupo de crianças com excesso de peso. Após a análise dos resultados do perfil fosfolipídico no modo negativo, o método PLS-DA demonstrou uma variância total de 65% (componente 1 56,3% e componente 2 8,7%), e, tal como no caso anterior, observou-se uma discriminação entre o grupo controlo e os grupos excesso de peso e obesidade, não sendo possível discriminar entre os grupos excesso de peso e obesidade (Figura 17 B). Na Figura 18 estão presentes as espécies moleculares de fosfolípidos que apresentaram maior influência na separação dos grupos observada no PLS-DA. No modo positivo (Figura 18 A), a maioria das espécies encontravam-se aumentadas no grupo de crianças de peso normal, com exceção da PC (O-30:1/P-30:0). Curiosamente, o grupo de crianças com excesso de peso apresentou uma diminuição mais acentuada de diversas espécies de fosfolípidos do que o grupo das

Caracterização do perfil fosfolipídico de crianças com excesso de peso e obesidade

crianças com obesidade. No modo negativo (Figura 18 B) os resultados foram semelhantes, com as crianças controlo a apresentarem níveis aumentados das espécies lipídicas, com exceção da PS (48:12).

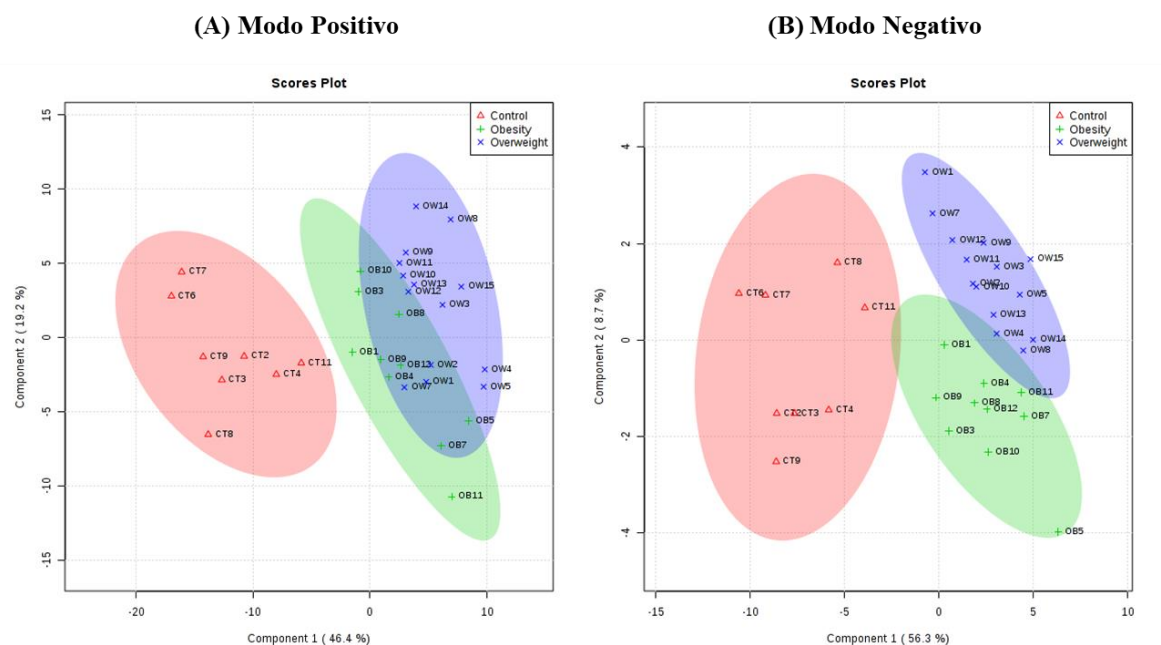


Figura 17—Mínimos Quadrados Parciais- Análise Discriminante (PLS-DA) com as 166 espécies fosfolípidos identificadas. **(A)** modo positivo onde a componente principal representa 46,4% de variância geral. **(B)** modo negativo onde a componente principal representa 56,3% de variância geral.

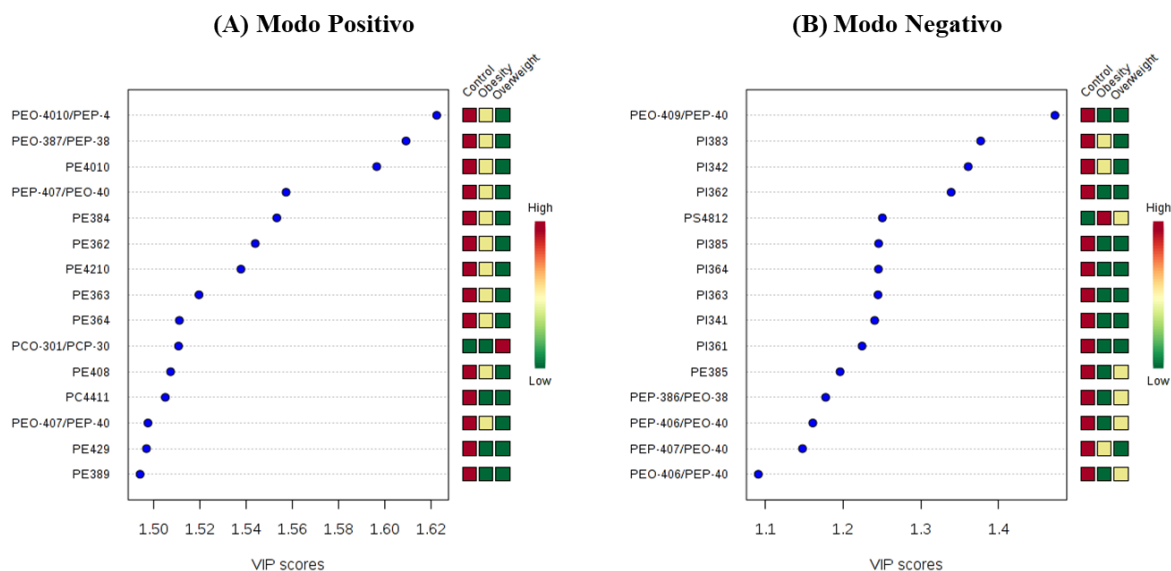


Figura 18—Lista de Importância Variável na Projeção (VIP) no modo positivo **(A)** e no modo negativo **(B)**.

Finalmente, para avaliar as espécies moleculares de fosfolípidos que variam significativamente entre os 3 grupos de crianças, realizou-se uma análise estatística univariada através do teste ANOVA e do teste *post-hoc* LSD. Através desta análise, e

considerando um *p-value* (FDR) <0,05, foi possível identificar diferenças significativas em 25 espécies de LPC, 27 espécies de PC, 33 espécies de PE, 16 espécies de SM no modo negativo e 24 espécies de PE, 1 espécies de PG, 9 espécies de PI e 1 espécies de PS no modo negativo (Tabela 12).

Tabela 12-Lista das 136 espécies moleculares de fosfolípidos que variam estatisticamente entre as crianças com obesidade (OB) e as controle (CT), entre as crianças com excesso de peso (EP) e as controle (CT) e entre as crianças com excesso de peso (EP) e as com obesidade (OB).

Modo Positivo									
Classe	Espécie Molecular	OB vs CT	EP vs CT	EP vs OB	Classe	Espécie Molecular	OB vs CT	EP vs CT	EP vs OB
LPC	14:0	↓	↓		LPC	20:5	↓	↓	
	14:1	↓	↓			22:4	↓	↓	
	16:0	↓	↓			22:5	↓	↓	
	16:1	↓	↓			22:6	↓	↓	
	18:0	↓	↓			24:0	↓	↓	
	18:1	↓	↓			O-16:0	↓	↓	
	18:2	↓	↓			O-16:1/P-16:0	↓	↓	
	18:3	↓	↓			O-18:0	↓	↓	
	18:4	↓	↓			O-18:1/P-18:0	↓	↓	
	20:0	↓	↓			O-20:0	↓	↓	
	20:1	↓	↓			P-18:1	↓	↓	
	20:2	↓	↓			P-20:0	↓	↓	
	20:4	↓	↓						
PC	32:0	↑			PC	40:6	↑		
	32:1	↑				40:7	↑		
	34:1	↑				40:8	↑	↑	
	36:2	↑	↑			40:9	↑	↑	
	36:3	↑				42:8	↑		
	36:4	↑	↑			42:9	↑	↑	
	36:5	↑	↑			44:10	↓	↓	
	38:3	↑	↑			44:11	↓	↓	
	38:4	↑	↑			44:12	↓		
	38:5	↑				O-30:1/P-30:0		↑	
	38:7	↑	↑			O-32:1/P-32:0	↑		
	38:8	↑				O-34:3/P-34:2		↑	
	40:0	↑	↑			P-38:6		↑	
	40:5	↑	↑						
PE	34:1	↓	↓	↓	PE	O-36:5/P-36:4	↓	↓	↓
	34:2	↓	↓	↓		O-38:4/P-38:3	↓	↓	↓
	36:2	↓	↓	↓		O-38:7/P-38:6	↓	↓	↓
	36:3	↓	↓	↓		O-38:8/P-38:7	↓	↓	↓
	36:4	↓	↓	↓		O-40:10/P-40:9	↓	↓	↓

Caracterização do perfil fosfolipídico de crianças com excesso de peso e obesidade

	38:4	↓	↓	↓		O-40:7/P-40:6	↓	↓	↓		
	38:6	↓	↓			O-40:9/P-40:8	↓	↓			
	38:7	↓	↓	↓		O-34:3/P-34:2	↓	↓			
	38:9	↓	↓			O-36:3/P-36:2	↓	↓			
	40:10	↓	↓	↓		O-36:4/P-36:3	↓	↓	↓		
	40:5	↓	↓	↓		O-38:5/P-38:4	↓	↓	↓		
	40:6	↓	↓	↓		O-38:6/P-38:5	↓	↓	↓		
	40:8	↓	↓	↓		P-38:8	↓	↓	↓		
	40:9	↓	↓	↓		O-40:5/P-40:4	↓	↓			
	42:10	↓	↓	↓		O-40:8/P-40:7	↓	↓	↓		
	42:9	↓	↓			P-46:12	↓	↓	↓		
	48:12	↓	↓	↓							
	SM	30:1	↓	↓			SM	36:3	↓	↓	
		32:0	↓	↓				38:2	↓	↓	
32:1		↓	↓		38:3	↓		↓			
34:0		↓	↓		40:1	↓		↓			
34:1		↓	↓		40:2	↓		↓			
34:2		↓	↓		40:3	↓		↓			
36:1		↓	↓		42:2	↓		↓			
36:2		↓	↓		42:3	↓		↓			
Modo Negativo											
Classe	Espécie Molecular	OB vs CT	EP vs CT	EP vs OB	Classe	Espécie Molecular	OB vs CT	EP vs CT	EP vs OB		
PE	34:1	↓	↓		PE	O-36:2/P-36:1	↓	↓			
	34:2	↓	↓			O-36:3/P-36:2	↓	↓			
	38:3	↓	↓			O-36:4/P-36:3	↓	↓			
	38:4	↓	↓			O-36:5/P-36:4	↓	↓			
	38:5	↓	↓			O-36:6/P-36:5	↓	↓			
	38:6	↓	↓			O-38:4/P-38:3	↓	↓			
	40:5	↓	↓			O-38:5/P-38:4	↓	↓			
	40:7	↓	↓			O-38:6/P-38:5	↓	↓			
	O-40:6/P-40:5	↓	↓			O-38:7/P-38:6	↓	↓			
	O-40:9/P-40:8	↓	↓			O-40:5/P-40:4	↓	↓			
	O-34:2/P-34:1	↓	↓			O-40:7/P-40:6	↓	↓			
	O-34:3/P-34:2	↓	↓			O-40:8/P-40:7	↓	↓			
PG	38:7		↓	↓							
PI	34:1	↓	↓		PI	36:4	↓	↓			
	34:2	↓	↓	↓		38:3	↓	↓	↓		
	36:1	↓	↓			38:4		↓			
	36:2	↓	↓			38:5	↓	↓			
	36:3	↓	↓								
PS	48:12	↑	↑	↓							

4. Discussão

A obesidade pediátrica tem vindo a aumentar na população mundial, constituindo um problema de saúde pública. Esta condição origina alterações metabólicas podendo ser responsável pelo desenvolvimento de outras patológicas, tais como T2DM, CVD e NAFLD. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo estudar alterações a nível fosfolipídico no soro de crianças com excesso de peso e com obesidade de modo a detetar possíveis biomarcadores relacionados com o desenvolvimento de comorbidades. Para tal, o soro de crianças com peso normal (controlo), excesso de peso e obesidade, foi estudado para identificar possíveis diferenças no perfil fosfolipídico consoante o BMI das crianças. Adicionalmente, em cada grupo de BMI, comparou-se o perfil de fosfolípidos de crianças do sexo feminino com crianças do sexo masculino, com o intuito de verificar se existem diferenças relacionadas com o sexo dos indivíduos. Assim, o estudo do perfil fosfolipídico do soro de crianças foi realizado com recurso a uma abordagem lipidómica com base nas técnicas de GC-MS e HPLC-MS e MS/MS.

O perfil de FA dos fosfolípidos foi estudado através da técnica GC-MS. Nesta análise foi possível verificar que não existem diferenças significativas entre o perfil de FA de crianças do sexo feminino e do sexo masculino. Adicionalmente, o perfil de FA de crianças com excesso de peso e de crianças com obesidade não apresentam diferenças significativas. Verificou-se, ainda, que tanto as crianças com excesso de peso como as crianças com obesidade apresentam diminuição das concentrações de ácido linoleico (C18:2 *n*-6) quando comparadas com as crianças do grupo controlo. Estes resultados estão de acordo com outro estudo já publicado que avaliou jovens obesos com e sem síndrome metabólica, em que ambos os grupos apresentavam uma diminuição dos níveis deste PUFA *n*-6, quando comparados com jovens de peso normal (95). Por outro lado, verificou-se um aumento do SFA ácido esteárico (C18:0) em crianças com excesso de peso e com obesidade e do ácido palmítico (C16:0) em crianças com obesidade, o que está de acordo com estudos que avaliaram os FA plasmático e verificaram um aumento destes SFA (69,96). Apesar dos FA analisados, se encontrarem esterificados nos fosfolípidos, podem estar envolvidos na regulação de vias de sinalização, uma vez que são rapidamente hidrolisados pela ação de enzimas como a fosfolipase A2. Os SFA estão associados à indução de inflamação através da ativação da via TLR4/NF- κ B, uma vez que esta via está envolvida na libertação de citocinas pró-inflamatórias, provenientes do

tecido adiposo (97,98). Contrariamente, os PUFA inibem a via anteriormente referida (98), o que leva à diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, designadamente IL-6 e TNF- α (99). Adicionalmente, parece haver uma relação entre as concentrações plasmáticas de PUFA e os níveis de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF β (99). Deste modo, o aumento de SFA e a diminuição de FA insaturados nas crianças com excesso de peso e obesidade pode contribuir para o aumento do estado da inflamação nestas condições, visto que estes FA são pró- e anti-inflamatórios, respetivamente. Estas alterações podem, assim, estar relacionadas com o desenvolvimento de outras doenças. Diversos estudos verificaram que indivíduos adultos com obesidade e T2DM apresentam um aumento das concentrações de SFA dos fosfolípidos, designadamente do ácido palmítico (16:0) e esteárico (C18:0), quando comparados com indivíduos com excesso de peso (100,101). Deste modo, o aumento destes SFA pode ser preditivo do aumento de risco de desenvolver T2DM. É ainda de notar que, o aumento do ácido palmítico (C16:0) e do ácido esteárico (C18:0), bem como a diminuição do ácido linoleico (C18:2 *n*-6) foram associados à NAFLD, pelo que os seus níveis podem ser representativos do risco de desenvolver esta doença, constituindo potenciais biomarcadores para lesões hepáticas (55,102).

A análise do perfil de fosfolípidos no soro foi realizada por HPLC-MS e MS/MS, tendo permitido identificar 7 classes de fosfolípidos, designadamente PC, LPC, SM, PE, PG, PS e PI. Relativamente ao modo positivo, através da análise estatística foi verificado que as espécies moleculares que mais contribuíram para a distinção entre crianças de peso normal e crianças com excesso de peso e obesidade, foram éteres de PE, nomeadamente PE (O-40:10 ou P-40:9) e PE (O-38:7 ou P-38:6), PE polinsaturadas, a PC (O-30:1 ou P-30:0) e a PC (44:11). Por outro lado, no modo negativo, as espécies moleculares que mais contribuíram para a distinção entre grupos pertencem à classe das PI e aos éteres de PE.

A PC e a LPC são classes de fosfolípidos abundantes no soro. No nosso estudo, verificou-se que as crianças com BMI acima do normal apresentavam níveis aumentados da maioria das PC e diminuídos de LPC. A PC é componente integral das lipoproteínas, sendo essencial para a sua formação e secreção (57). Diversos estudos reportaram um aumento em indivíduos adultos obesos dos níveis de diversas espécies moleculares de PC também identificadas neste trabalho, como a PC (32:0), a PC (36:4) e a PC (38:3) (42). O aumento de diversas espécies moleculares desta classe identificadas no nosso estudo foi, também, associado a outras doenças. A título de exemplo, as espécies PC (32:2), PC

(36:4) e PC (38:3) encontram-se aumentadas em indivíduos adultos obesos com resistência à insulina ou T2DM (43,47,103), enquanto a espécie PC (38:3) encontra-se aumentada em indivíduos adultos com maior risco de desenvolver CVD (27). Relativamente às LPC, vários estudos realizados em crianças (72,73) e em adultos reportaram uma diminuição dos níveis de LPC, incluindo de várias espécies identificadas neste trabalho, como a LPC (18:3), LPC (20:4) e a LPC (22:6) (6,19). Estas espécies de LPC polinsaturadas parecem estar relacionadas com a proteína C-reativa, um marcador de inflamação (6). Adicionalmente, as LPC contribuem para a absorção de glucose pelos adipócitos através da ativação da proteína cinase C δ (77). Assim, as LPC apresentam um efeito benéfico no metabolismo da glucose, pelo que a diminuição dos seus níveis pode contribuir para o desenvolvimento da T2DM (44,77). No entanto, a variação e o papel das LPC na T2DM não está esclarecida, uma vez que alguns autores apontam para um aumento de diversas espécies de LPC em indivíduos obesos com T2DM (104,105), enquanto outros apontam para uma diminuição (44). É, ainda de salientar, a diminuição de LPC em indivíduos adultos com CVD (27) e em indivíduos adultos com NAFLD (88). Uma fonte de níveis plasmáticos de LPC é a enzima LCAT que atua nas lipoproteínas (106), no entanto, as LPC séricas são predominantemente produzidas a partir das PC por ação da fosfolipase A2 (PLA2) que remove um FA da posição sn-2 das PC (30). Neste contexto, os nossos resultados relativos aos níveis de PC e LPC, sugerem uma diminuição da atividade da PLA2, o que não está de acordo com outros estudos que avaliaram a atividade desta enzima em crianças e adolescentes com obesidade (107,108). Assim, e uma vez que a atividade da PLA2 foi associada ao aumento de BMI (107,108), era de esperar uma diminuição das concentrações de PC e um aumento de PC, o que não se verificou. Deste modo, o aumento da classe das PC e a diminuição das LPC em indivíduos com excesso de peso e obesidade está de acordo com o que foi reportado por outros autores, estando relacionado com a inflamação e com o desenvolvimento de outras doenças como a T2DM, as CVD e a NAFLD. Contudo, e uma vez que a atividade da PLA2 está aumentada em crianças com obesidade (107,108), é necessário esclarecer os processos que regulam os níveis destas classes em indivíduos obesos de modo a conhecer melhor os mecanismos patofisiológicos da obesidade e suas complicações.

As crianças com excesso de peso e com obesidade, deste estudo, demonstraram uma diminuição de algumas espécies moleculares de PE, sendo maioritariamente espécies polinsaturadas. Contrariamente, outros estudos em adultos obesos reportaram um

aumento de algumas espécies de PE, também identificadas neste trabalho, como é o caso da PE (38:4) e da PE (38:6) (15,42). Diversos artigos na literatura reportaram, ainda, um aumento das concentrações de várias espécies de PE, designadamente da PE (34:2) e da PE (38:4), em adultos obesos e com T2DM (105,109). Recentemente, em plasma de adultos com NAFLD foi, também, descrito um aumento dos níveis plasmáticos totais de PE relacionado com a progressão da doença (110). Deste modo, e tendo em conta que as crianças deste estudo apresentaram uma diminuição dos níveis de PE, podemos sugerir que os níveis desta classe nas crianças em estudo não refletem o risco de desenvolver estas complicações associadas à obesidade.

Curiosamente, a maioria das espécies moleculares da classe das PE são éteres de PE. No nosso estudo, os níveis séricos de alguns éteres de PE nas crianças com excesso de peso e nas crianças com obesidade estão significativamente diminuídos, o que está de acordo com outros estudos que reportaram uma diminuição dos níveis de plasmalogéneos em indivíduos com obesidade (23,72,73,111). A função dos éteres de fosfolípidos ainda não é bem conhecida. No entanto, foi sugerido que os plasmalogéneos, as espécies mais abundantes de éteres de fosfolípidos, apresentam um efeito antioxidante no organismo, especialmente os plasmalogéneos de PE (111). Os plasmalogéneos podem atuar como agentes quelantes, como o EDTA, ou contribuir para a eliminação de radicais livres (111). A oxidação da ligação éter de vinilo dos plasmalogéneos previne a oxidação de PUFA, o que demonstra que as espécies de plasmalogéneos protegem a membrana lipídica da oxidação sem, no entanto, produzir elevadas quantidades de produtos tóxicos (111,112). Deste modo, os níveis diminuídos de éteres de fosfolípidos, podem sugerir o consumo dos mesmos por oxidação, contribuindo para o aumento do stress oxidativo na obesidade, e consequentemente, para o desenvolvimento de outras complicações. De facto, Graessler et al. verificaram que indivíduos com hipertensão e, consequentemente maior risco de desenvolver CDV, apresentam uma diminuição das concentrações de plasmalogéneos, especialmente os que contêm AA (C20:4) e ácido docosapentanóico (C22:5) (42). Estes dados estão de acordo aos resultados por nós obtidos, na medida em que, a PE (O-38:7/P-38:6) e a PE (O-38:5/P-38:6) apresentam na sua constituição AA e são duas das espécies que mais contribuem para a separação das crianças controlo e das crianças com BMI elevado. De modo semelhante, os plasmalogéneos de PE estão diminuídos em indivíduos com T2DM e com resistência à insulina (23,105,113). Assim, os níveis diminuídos de éteres de fosfolípidos podem ser marcadores do stress oxidativo na obesidade e

comorbidades, podendo contribuir para o aumento do stress oxidativo, pois diminuem as defesas anti-oxidantes, ou sendo uma consequência do mesmo, uma vez que podem ser consumidos por oxidação. Contudo, outros estudos reportaram um aumento dos éteres de outros fosfolípidos em adultos obesos, nomeadamente éteres de PC (15,43), o que está de acordo com os resultados obtidos neste estudo onde se verificou um aumento de PC (O-30:1/P-30:0), PC (O-32:1/P-32:0), PC (O-34:3/P-34:2) e PC (P-38:6) em crianças obesas e com excesso de peso. Como referido anteriormente, esta classe apresenta propriedades antioxidantes, pelo que o aumento destas espécies nas crianças com BMI elevado pode representar uma resposta do organismo ao aumento do stress oxidativo (15). Ainda assim, diversos estudos verificaram que indivíduos obesos com T2DM apresentam uma diminuição da concentração de várias espécies de éteres de PC, nomeadamente da PC (O-30:0), PC (O-32:1), PC (O-34:3) e PC (O-36:3) (44,103,109). Apesar do papel dos éteres de fosfolípidos no organismo ser pouco conhecido, neste estudo verificou-se um aumento de éteres de PC e uma diminuição de éteres de PE em crianças com excesso de peso ou obesidade. Em trabalhos futuros seria interessante esclarecer a função de cada um destes éteres de fosfolípidos, bem como a sua resposta em indivíduos com BMI acima do normal, uma vez que a sua presença e efeitos podem depender da severidade da doença de cada indivíduo.

A classe das PI é uma das classes que, neste trabalho, mais contribui para a distinção de crianças com diferentes BMI. Baseado na análise do fosfolipidoma no modo negativo, foi verificado que os níveis de PI se encontram diminuídos em crianças com excesso de peso e obesidade. Apesar de ser pouco conhecida a sua função no plasma, as PI estão envolvidas em diversas vias de sinalização e influenciam a estrutura e a função de lipoproteínas (110). A administração de PI em adultos com peso normal ou com excesso de peso, induz o aumento de HDL, possivelmente através da mobilização do Ch para estas lipoproteínas, bloqueando o transporte e armazenamento de Ch nas LDL, o que leva a uma diminuição do risco de desenvolver CVD (114). Adicionalmente, os níveis da classe de PI está aumentada em indivíduos com NAFLD, sugerindo uma alteração do metabolismo de fosfolípidos no fígado (110). Assim, pode sugerir-se que o aumento de PI diminui o risco de CVD e aumenta o risco de NAFLD. Por outro lado, a diminuição de PI, designadamente das espécies PI (34:0, PI 16:0/18:0), PI (38:4, PI 18:0/20:4), PI (40:6, PI 18:0/22:6) foi observada em indivíduos obesos com T2DM (105).

Outra classe fosfolipídica minoritária no plasma é a das PS, sendo que neste estudo apenas se identificou uma espécie molecular de PS, a PS (48:12), como significativamente mais elevada em crianças com excesso de peso e obesidade. As PS têm um papel importante na apoptose celular uma vez que a sua localização na parte externa da membrana celular é uma resposta a estímulos sinalizadores de apoptose (110,115). No entanto, e à semelhança das PI, a função das PS no plasma não está esclarecida.

As SM são os esfingolípidos mais abundantes nas lipoproteínas, constituindo cerca de 20% dos fosfolípidos totais do plasma (21). No nosso estudo as crianças com excesso de peso e as crianças obesas apresentam uma diminuição dos níveis de SM quando comparadas com crianças de peso normal. As SM podem ser hidrolisadas por ação da esfingomielinase, originando Cer que, por sua vez, pela ação da esfingomielina sintase são novamente convertidas a SM (21). Na obesidade, o aumento dos adipócitos e macrófagos induz um aumento da produção de citocinas inflamatórias que ativam diversas enzimas e processos metabólicos o que, consequentemente, leva ao aumento de Cer via hidrólise de SM e lipogénese *de novo* (21). Estudos anteriores reportaram que as SM encontravam-se aumentadas em adultos com obesidade (30), contudo noutro estudo, os autores reportaram que em crianças obesas não se verificou um aumento das concentrações de SM, o que pode dever-se ao equilíbrio entre a síntese de espécies desta classe e o seu metabolismo (73). De facto, sabe-se que na obesidade ocorre um aumento da expressão da enzima esfingomielinase (61), que tem como função a hidrólise de SM a Cer, o que pode justificar a diminuição dos níveis de SM observados. Adicionalmente, o aumento da expressão desta enzima pode induzir um aumento de Cer que pode aumentar o risco de T2DM, uma vez que as Cer favorecem a apoptose das células β -pancreáticas (79). No entanto, é necessário esclarecer a variação e o significado dos níveis de SM nas crianças com elevado BMI, uma vez que esta classe fosfolipídica pode refletir o risco de desenvolver T2DM ou outras patologias.

Por fim, é de realçar que as crianças com excesso de peso apresentam uma variação do perfil fosfolipídico bastante semelhante ao das crianças com obesidade. Tal sugere que, apesar de não possuírem um BMI tão elevado como na obesidade, as crianças com excesso de peso já apresentam alterações do fosfolipidoma, pelo que podem, igualmente, estar em risco de desenvolver outras doenças.

5. Conclusão e Perspetivas Futuras

A obesidade é uma doença com uma crescente prevalência não só em adultos, mas também em crianças e adolescentes. Esta condição é caracterizada por modificações metabólicas e por um aumento da inflamação, podendo levar ao desenvolvimento de outras patologias, como a T2DM, as CVD e a NAFLD. Para compreender as modificações a nível lipídico induzidas pela obesidade pediátrica, neste trabalho foram avaliadas as alterações das espécies moleculares fosfolipídicas em crianças com excesso de peso e obesidade. Assim, foi possível observar que as crianças com excesso de peso não apresentaram diferenças significativas nas espécies fosfolipídicas identificadas, quando comparadas com as crianças com obesidade. Contudo, foram observadas alterações significativas entre as crianças de peso normal e as crianças com excesso de peso e obesidade. Assim, é possível afirmar que o aumento do tecido adiposo induz alterações no metabolismo lipídico.

Os resultados obtidos neste trabalho, demonstraram que as alterações no perfil de ácidos gordos esterificados em fosfolipídicos das crianças com excesso de peso e obesas, evidenciados pelo aumento de FA saturados e pela diminuição do ácido linoleico, podem estar associadas ao aumento do estado inflamatório característico da obesidade. Não se verificou, no entanto, diferenças significativas relacionadas com o sexo dos indivíduos. As crianças com excesso de peso, apesar de não possuírem um BMI tão elevado como as crianças com obesidade, também apresentam alterações no perfil fosfolipídico, uma vez que existem diferenças significativas entre o perfil de ácidos gordos de crianças com excesso de peso e de crianças de peso normal. As alterações mais evidentes no perfil de fosfolípidos revelam-se na diminuição dos níveis séricos de LPC, SM e éteres de PE e no aumento de algumas espécies de PC, o que pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de T2DM, CVD e NAFLD. Para além disso, os níveis séricos significativamente diminuídos de éteres de PE podem estar associados à diminuição das defesas anti-oxidantes e ao aumento do processo inflamatório. No entanto, a relação entre a inflamação e os níveis significativamente aumentados de éteres de PC não está esclarecida. Foram, ainda, identificadas diferenças significativas em espécies moleculares pertencentes à classe das PI e PS que, em conjunto com as outras classes anteriormente referidas, poderão ser exploradas, no futuro, como potenciais biomarcadores lipídicos.

De facto, as classes de fosfolípidos LPC, PC e PE têm sido reportadas como estando relacionadas com o aparecimento de co-morbididades da obesidade. Estas alterações podem estar associadas a mecanismos lipídicos e processos inflamatórios que contribuam para o desenvolvimento de outras doenças associadas à obesidade.

Futuramente, será interessante analisar crianças de diferentes subgrupos de BMI no grupo de crianças com excesso de peso, para avaliar a partir de que percentil de BMI se detetam alterações significativas nos fosfolípidos. Para além disso, a amostragem deveria ser mais representativa de modo a suportar os resultados. Seria, ainda, interessante estudar a atividade de algumas enzimas como a PLA2, a LCAT e a esfingomielinase, bem como avaliar a presença de Cer no soro, com o intuito de esclarecer as alterações das classes LPC, PC e dos esfingolípidos na obesidade pediátrica. Adicionalmente, são necessários mais estudos de modo a identificar possíveis biomarcadores séricos para o diagnóstico e prevenção de doenças associadas à obesidade pediátrica

6. Bibliografia

1. Engeland A, Bjørge T, Sjøgaard AJ, Tverdal A. Body mass index in adolescence in relation to total mortality: 32-Year follow-up of 227,000 Norwegian boys and girls. *Am J Epidemiol.* 2003;157:517–23.
2. GBD 2015 Obesity Collaborators. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med.* 2017;377:13–27.
3. Knight JA. Diseases and disorders associated with excess body weight. *Ann Clin Lab Sci.* 2011;41(2):107–21.
4. Klop B, Elte JWF, Cabezas MC. Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. *Nutrients.* 2013;5:1218–40.
5. Pietiläinen KH, Rissanen A, Kaprio J, Mäkimattila S, Häkkinen A-M, Westerbacka J, et al. Acquired obesity is associated with increased liver fat, intra-abdominal fat, and insulin resistance in young adult monozygotic twins. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2005;288:E768–74. Available from: <http://ajpendo.physiology.org/cgi/content/abstract/288/4/E768>
6. Bas JMD, Caimari A, Rodriguez-Naranjo MI, Childs CE, Chavez CP, West AL, et al. Impairment of lysophospholipid metabolism in obesity: Altered plasma profile and desensitization to the modulatory properties of n-3 polyunsaturated fatty acids in a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2016;104:266–79.
7. Schwabe RF, Wiley JW, Editors S, Cusi K. Role of Obesity and Lipotoxicity in the Development of Nonalcoholic Steatohepatitis: Pathophysiology and Clinical Implications. *Gastroenterology* [Internet]. 2012;142(4):711–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2012.02.003>
8. Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2006;83 (suppl)(2):461S–465S. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16470013>
9. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med.* 2001;7(8):941–6.
10. Considine R V., Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum Immunoreactive-Leptin Concentrations in Normal-Weight and Obese Humans. *N Engl J Med* [Internet]. 1996;334:292–5. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00019616-199607000-00020>
11. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and Subcutaneous Adipose Tissues of Obese Subjects Release Interleukin-6: Depot Difference and Regulation by

- Glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:847–50.
12. Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: Role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2062–8.
 13. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med.* 2009;15(8):914–20.
 14. Weisberg S, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel R, Ferrante Jr A. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1796–808.
 15. Donovan EL, Pettine SM, Hickey MS, Hamilton KL, Miller BF. Lipidomic analysis of human plasma reveals ether-linked lipids that are elevated in morbidly obese humans compared to lean. *Diabetol Metab Syndr* [Internet]. 2013;5(24):1–13. Available from: <http://dmsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1758-5996-5-24>
 16. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Murphy RC, et al. A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* [Internet]. 2005;46:839–62. Available from: <http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.E400004-JLR200>
 17. Quehenberger O, Armando AM, Brown AH, Milne SB, Myers DS, Merrill AH, et al. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *J Lipid Res.* 2010;51(11):3299–305.
 18. Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, Nishijima M, Raetz CRH, Shimizu T, et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl.:S9–14.
 19. Heimerl S, Fischer M, Baessler A, Liebisch G, Sigrüener A, Wallner S, et al. Alterations of plasma lysophosphatidylcholine species in obesity and weight loss. *PLoS One.* 2014;9(10):e111348.
 20. Wiesner P, Leidl K, Boettcher A, Schmitz G, Liebisch G. Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Lipid Res* [Internet]. 2009;50:574–85. Available from: <http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.D800028-JLR200>
 21. Iqbal J, Walsh MT, Hammad SM, Hussain MM. Sphingolipids and Lipoproteins in Health and Metabolic Disorders. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2017;28(7):506–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2017.03.005>
 22. Serna J, García-Seisdedos D, Alcázar A, Lasunción MÁ, Busto R, Pastor Ó. Quantitative lipidomic analysis of plasma and plasma lipoproteins using MALDI-TOF mass spectrometry. *Chem Phys Lipids* [Internet]. 2015;189:7–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.05.005>

23. Pietiläinen KH, Sysi-Aho M, Rissanen A, Seppänen-Laakso T, Yki-Järvinen H, Kaprio J, et al. Acquired obesity is associated with changes in the serum lipidomic profile independent of genetic effects - A monozygotic twin study. *PLoS One*. 2007;2(2):e218.
24. Pickens CA, Vazquez AI, Jones AD, Fenton JI. Obesity, adipokines, and C-peptide are associated with distinct plasma phospholipid profiles in adult males, an untargeted lipidomic approach. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–14. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-05785-0>
25. Barber MN, Risis S, Yang C, Meikle PJ, Staples M, Febbraio MA, et al. Plasma lysophosphatidylcholine levels are reduced in obesity and type 2 diabetes. *PLoS One*. 2012;7(7):e41456.
26. Rhee EP, Cheng S, Larson MG, Walford GA, Lewis GD, McCabe E, et al. Lipid profiling identifies a triacylglycerol signature of insulin resistance and improves diabetes prediction in humans. *J Clin Invest*. 2011;121(4):1402–11.
27. Holčápek M, Červená B, Cífková E, Lída M, Chagovets V, Vostálová J, et al. Lipidomic analysis of plasma, erythrocytes and lipoprotein fractions of cardiovascular disease patients using UHPLC/MS, MALDI-MS and multivariate data analysis. *J Chromatogr B*. 2015;990:52–63.
28. Ishikawa M, Maekawa K, Saito K, Senoo Y, Urata M, Murayama M, et al. Plasma and serum lipidomics of healthy white adults shows characteristic profiles by subjects' gender and age. *PLoS One*. 2014;9(3):e91806.
29. Ishikawa M, Tajima Y, Murayama M, Senoo Y, Maekawa K, Saito Y. Plasma and Serum from Nonfasting Men and Women Differ in Their Lipidomic Profiles. *Biol Pharm Bull* [Internet]. 2013;36(4):682–5. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84876922121&partnerID=tZOtx3y1%5Cnhttp://jlc.jst.go.jp/DN/JST.JSTAGE/bpb/b12-00799?lang=en&from=CrossRef&type=abstract>
30. Weir JM, Wong G, Barlow CK, Greeve MA, Kowalczyk A, Almasy L, et al. Plasma lipid profiling in a large population-based cohort. *J Lipid Res* [Internet]. 2013;54(10):2898–908. Available from: <http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.P035808>
31. Sales S, Graessler J, Ciucci S, Al-Atrib R, Vihervaara T, Schuhmann K, et al. Gender, Contraceptives and Individual Metabolic Predisposition Shape a Healthy Plasma Lipidome. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6:27710. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep27710>
32. Maekawa K, Okemoto K, Ishikawa M, Tanaka R, Kumagai Y, Saito Y. Plasma Lipidomics of Healthy Japanese Adults Reveals Gender- and Age-Related Differences. *J Pharm Sci* [Internet]. 2017;106:2914–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2017.05.002>

33. Saito K, Maekawa K, Pappan KL, Urata M, Ishikawa M, Kumagai Y, et al. Differences in metabolite profiles between blood matrices, ages, and sexes among Caucasian individuals and their inter-individual variations. *Metabolomics*. 2014;10:402–13.
34. Cai X, Perttula K, Pajouh SK, Hubbard AE, Nomura DK, Rappaport SM. Untargeted Lipidomic Profiling of Human Plasma Reveals Differences due to Race, Gender and Smoking Status. *Metabolomics Open Access* [Internet]. 2014;4(1):131. Available from: <http://omicsonline.org/open-access/untargeted-lipidomic-profiling-of-human-plasma-reveals-differences-due-to-race-gender-and-smoking-status-2153-0769-1000131.php?aid=29898>
35. Wang-Sattler R, Yu Y, Mittelstrass K, Lattka E, Altmaier E, Gieger C, et al. Metabolic profiling reveals distinct variations linked to nicotine consumption in humans - First results from the KORA study. *PLoS One*. 2008;3(12):e3863.
36. Lankinen M, Schwab U, Kolehmainen M, Paananen J, Nygren H, Seppanen-Laakso T, et al. A Healthy Nordic Diet Alters the Plasma Lipidomic Profile in Adults with Features of Metabolic Syndrome in a Multicenter Randomized Dietary Intervention. *J Nutr* [Internet]. 2016;146:662–72. Available from: <http://jn.nutrition.org/cgi/doi/10.3945/jn.115.220459>
37. Meikle PJ, Barlow CK, Mellett NA, Mundra PA, Bonham MP, Larsen A, et al. Postprandial Plasma Phospholipids in Men Are Influenced by the Source of Dietary Fat. *J Nutr* [Internet]. 2015;145(9):2012–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26180244>
38. Nestel PJ, Straznicki N, Mellett NA, Wong G, Souza DP De, Tull DL, et al. Specific plasma lipid classes and phospholipid fatty acids indicative of dairy food consumption associate with insulin sensitivity. *Am J Clin Nutr*. 2014;99:46–53.
39. Menni C, Zhai G, MacGregor A, Prehn C, Römisch-Margl W, Suhre K, et al. Targeted metabolomics profiles are strongly correlated with nutritional patterns in women. *Metabolomics*. 2013;9:506–14.
40. Kim JY, Park JY, Kim OY, Ham BM, Kim H-J, Kwon DY, et al. Metabolic profiling of plasma in overweight/obese and lean men using ultra performance liquid chromatography and Q-TOF mass spectrometry (UPLC– Q-TOF MS). *J Proteome Res* [Internet]. 2010;9:4368–75. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr100101p>
41. Jové M, Naudí A, Portero-Otin M, Cabré R, Rovira-Llopis S, Bañuls C, et al. Plasma lipidomics discloses metabolic syndrome with a specific HDL phenotype. *FASEB J*. 2014;28(12):5163–71.
42. Graessler J, Schwudke D, Schwarz PEH, Herzog R, Schevchenko A, Bornstein SR. Top-down lipidomics reveals ether lipid deficiency in blood plasma of hypertensive patients. *PLoS One*. 2009;4(7):e6261.
43. Scherer M, Montoliu I, Qanadli SD, Collino S, Rezzi S, Kussmann M, et al. Blood plasma

- lipidomic signature of epicardial fat in healthy obese women. *Obesity*. 2015;23(1):130–7.
44. Tonks KT, Coster AC, Christopher MJ, Chaudhuri R, Xu A, Gagnon-Bartsch J, et al. Skeletal muscle and plasma lipidomic signatures of insulin resistance and overweight/obesity in humans. *Obesity*. 2016;24:908–16.
 45. Kotronen A, Velagapudi VR, Yetukuri L, Westerbacka J, Bergholm R, Ekroos K, et al. Serum saturated fatty acids containing triacylglycerols are better markers of insulin resistance than total serum triacylglycerol concentrations. *Diabetologia*. 2009;52:684–90.
 46. Quehenberger O, Dennis EA. The Human Plasma Lipidome. *N Engl J Med*. 2012;365(19):1812–23.
 47. Rauschert S, Uhl O, Koletzko B, Kirchberg F, Mori TA, Huang RC, et al. Lipidomics reveals associations of phospholipids with obesity and insulin resistance in young adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101:871–9.
 48. Haus JM, Kashyap SR, Kasumov T, Zhang R, Kelly KR, Defronzo RA, et al. Plasma ceramides are elevated in obese subjects with type 2 diabetes and correlate with the severity of insulin resistance. *Diabetes*. 2009;58:337–43.
 49. Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, et al. A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metab*. 2009;9(4):311–26.
 50. Kim HJ, Kim JH, Noh S, Hur HJ, Sung MJ, Hwang JT, et al. Metabolomic Analysis of Livers and Serum from High Fat Diet Induced Obese Mice. *J Proteome Res* [Internet]. 2010;10:722–31. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr100892r>
 51. Huang YH, Schäfer-Elinder L, Wu R, Claesson HE, Frostegård J. Lysophosphatidylcholine (LPC) induces proinflammatory cytokines by a platelet-activating factor (PAF) receptor-dependent mechanism. *Clin Exp Immunol*. 1999;116(2):326–31.
 52. Hung ND, Sok DE, Kim MR. Prevention of 1-palmitoyl lysophosphatidylcholine-induced inflammation by polyunsaturated acyl lysophosphatidylcholine. *Inflamm Res*. 2012;61:473–83.
 53. Eisinger K, Liebisch G, Schmitz G, Aslanidis C, Krautbauer S, Buechler C. Lipidomic analysis of serum from high fat diet induced obese mice. *Int J Mol Sci*. 2014;15:2991–3002.
 54. Schmitz G, Ruebsaamen K. Metabolism and atherogenic disease association of lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis*. 2010;208(1):10–8.
 55. Puri P, Wiest MM, Cheung O, Mirshahi F, Sargeant C, Min H-K, et al. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2009;50(6):1827–38.
 56. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie* [Internet]. 2009;91:791–5. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2009.01.008>
57. van der Veen JN, Kennelly JP, Wan S, Vance JE, Vance DE, Jacobs RL. The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2017;1859(9):1558–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.04.006>
 58. Braverman NE, Moser AB. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2012;1822(9):1442–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.008>
 59. Nilsson Å, Duan R-D. Absorption and lipoprotein transport of sphingomyelin. *J Lipid Res* [Internet]. 2006;47:154–71. Available from: <http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.M500357-JLR200>
 60. Mamtani M, Meikle PJ, Kulkarni H, Weir JM, Barlow CK, Jowett JB, et al. Plasma dihydroceramide species associate with waist circumference in Mexican American families. *Obesity*. 2014;22(3):950–6.
 61. Samad F, Hester KD, Yang G, Hannun YA, Bielawski J. Altered adipose and plasma sphingolipid metabolism in obesity: A potential mechanism for cardiovascular and metabolic risk. *Diabetes*. 2006;55:2579–87.
 62. Watson AD. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. *J Lipid Res* [Internet]. 2006;47:2101–11. Available from: <http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.R600022-JLR200>
 63. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H. GPR120 is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-Inflammatory and Insulin Sensitizing Effects. *Cell*. 2010;142(5):687–98.
 64. Monteiro J, Leslie M, Moghadasian MH, Arendt BM, Allard JP, Ma DWL. The role of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids in the manifestation of the metabolic syndrome in cardiovascular disease and non- alcoholic fatty liver disease. *Food Funct*. 2014;5:426–35.
 65. Todoric J, Löffler M, Huber J, Bilban M, Reimers M, Kadl A, et al. Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetologia*. 2006;49(9):2109–19.
 66. Perreault M, Zulyniak MA, Badoud F, Stephenson S, Badawi A, Buchholz A, et al. A distinct fatty acid profile underlies the reduced inflammatory state of metabolically healthy obese individuals. *PLoS One*. 2014;9(2):e88539.
 67. Olson J, Aldrich H, Callahan TJ, Matthews EE, Gance-Cleveland B. Characterization of Childhood Obesity and Behavioral Factors. *J Pediatr Heal Care* [Internet]. 2016;30:444–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pedhc.2015.10.009>
 68. Scaglioni S, Verduci E, Salvioni M, Bruzzese MG, Radaelli G, Zetterström R, et al. Plasma long-chain fatty acids and the degree of obesity in Italian children. *Acta Paediatr*.

- 2006;95:964–9.
69. Okada T, Sato NF, Kuromori Y, Miyashita M, Taniguchi K, Iwata F, et al. Characteristics of obese children with low content of arachidonic acid in plasma lipids. *Pediatr Int* [Internet]. 2007;49:437–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17587264>
 70. Okada T, Furuhashi N, Kuromori Y, Miyashita M, Iwata F, Harada K. Plasma palmitoleic acid content and obesity in children. *Am J Clin Nutr*. 2005;82:747–50.
 71. Gil-Campos M, Del Carmen Ramírez-Tortosa M, Larqué E, Linde J, Aguilera CM, Cañete R, et al. Metabolic syndrome affects fatty acid composition of plasma lipids in obese prepubertal children. *Lipids*. 2008;43:723–32.
 72. Syme C, Czajkowski S, Shin J, Abrahamowicz M, Leonard G, Perron M, et al. Glycerophosphocholine Metabolites and Cardiovascular Disease Risk Factors in Adolescents: A Cohort Study. *Circulation*. 2016;134:1629–36.
 73. Wahl S, Yu Z, Kleber M, Singmann P, Holzapfel C, He Y, et al. Childhood obesity is associated with changes in the serum metabolite profile. *Obes Facts*. 2012;5:660–70.
 74. Reinehr T, Wolters B, Knop C, Lass N, Hellmuth C, Harder U, et al. Changes in the serum metabolite profile in obese children with weight loss. *Eur J Nutr*. 2015;54:173–81.
 75. Rzehak P, Hellmuth C, Uhl O, Kirchberg FF, Peissner W, Harder U, et al. Rapid growth and childhood obesity are strongly associated with LysoPC(14:0). *Ann Nutr Metab*. 2014;64:294–303.
 76. Virtue S, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome - An allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2010;1801:338–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbaliip.2009.12.006>
 77. Yea K, Kim J, Yoon JH, Kwon T, Kim JH, Lee BD, et al. Lysophosphatidylcholine activates adipocyte glucose uptake and lowers blood glucose levels in murine models of diabetes. *J Biol Chem*. 2009;284(49):33833–40.
 78. Meikle PJ, Wong G, Barlow CK, Weir JM, Greeve MA, MacIntosh GL, et al. Plasma Lipid Profiling Shows Similar Associations with Prediabetes and Type 2 Diabetes. *PLoS One*. 2013;8(9):e74341.
 79. Shimabukuro M, Higa M, Zhou Y, Wang M, Newgard CB, Unger RH. Lipoapoptosis in Beta-cells of Obese Prediabetic fa / fa Rats. *J Biol Chem*. 1998;273(49):32487–90.
 80. Hwang YC, Fujimoto WY, Hayashi T, Kahn SE, Leonetti DL, Boyko EJ. Increased visceral adipose tissue is an independent predictor for future development of atherogenic dyslipidemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(2):678–85.
 81. Kriszbacher I, Koppán M, Bódis J. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685–95.
 82. Fernandez C, Sandin M, Sampaio JL, Almgren P, Narkiewicz K, Hoffmann M, et al.

- Plasma Lipid Composition and Risk of Developing Cardiovascular Disease. *PLoS One*. 2013;8(8):e71846.
83. Stegeman C, Pechlaner R, Willeit P, Langley SR, Mangino M, Mayr U, et al. Lipidomics profiling and risk of cardiovascular disease in the prospective population-based bruneck study. *Circulation*. 2014;129:1821–31.
 84. Stegeman C, Drozdov I, Shalhoub J, Humphries J, Ladroue C, Didangelos A, et al. Comparative lipidomics profiling of human atherosclerotic plaques. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4:232–42.
 85. Yeboah J, Mcnamara C, Cheng X, Tabas I, David M. Association of plasma sphingomyelin levels and incident coronary heart disease events in an adult population: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(3):628–33.
 86. Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Biochemical, Metabolic and Clinical Implications NIH Public Access. *Hepatology*. 2010;51(2):679–89.
 87. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2007;46:1081–90.
 88. Orešič M, Hyötyläinen T, Kotronen A, Gopalacharyulu P, Nygren H, Arola J, et al. Prediction of non-alcoholic fatty-liver disease and liver fat content by serum molecular lipids. *Diabetologia*. 2013;56:2266–74.
 89. Rito A, Breda J, Carmo I. Guia de Avaliação do Estado Nutricional Infantil e Juvenil. Dgs-Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. 2010. 60 p.
 90. Bartlett EM, Lewis DH. Spectrophotometric determination of phosphate esters in the presence and absence of orthophosphate. *Anal Biochem*. 1970;36:159–67.
 91. International Union of Pure and Applied Chemistry, Applied Chemistry Division, Commission on Oils F and D. Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1987.
 92. Christie WW. Mass Spectra of Fatty Acid Methyl Esters-Archive [Internet]. 2017 [cited 2018 Mar 8]. Available from: <http://www.lipidhome.co.uk/ms/methesters/research/index.htm>
 93. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:395.
 94. Mayo Foundation for Medical Education and Research [Internet]. Pediatric Test Reference Values. 2017 [cited 2018 Feb 5]. Available from: <https://www.mayomedicallaboratories.com/test-info/pediatric/refvalues/reference.php>
 95. Bermúdez-Cardona J, Velásquez-Rodríguez C. Profile of free fatty acids and fractions of

- phospholipids, cholesterol esters and triglycerides in serum of obese youth with and without metabolic syndrome. *Nutrients*. 2016;8(54):1–13.
96. Pickens CA, Sordillo L, Comstock SS, Harris WS, Hortos K, Kovan B, et al. Plasma phospholipids, non-esterified plasma polyunsaturated fatty acids and oxylipids are associated with BMI. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 2015;95:31–40.
 97. Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, Itoh M, Yuan X, Mizuarai S, et al. Role of the Toll-like receptor 4/NF- κ B pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:84–91.
 98. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated Fatty Acids, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induce the Expression of Cyclooxygenase-2 Mediated through Toll-like Receptor 4. *J Biol Chem*. 2001;276(20):16683–9.
 99. Ferrucci L, Cherubini A, Bandinelli S, Bartali B, Corsi A, Lauretani F, et al. Relationship of Plasma Polyunsaturated Fatty Acids to Circulating Inflammatory Markers. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2006;91:439–46. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2005-1303>
 100. Wang L, Folsom AR, Zheng Z-J, Pankow JS, Eckfeldt JH. Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2003;78:91–8. Available from: <http://www.ajcn.org/cgi/content/abstract/78/1/91>
 101. Hodge AM, English DR, O’Dea K, Sinclair AJ, Makrides M, Gibson RA, et al. Plasma phospholipid and dietary fatty acids as predictors of type 2 diabetes: Interpreting the role of linoleic acid. *Am J Clin Nutr*. 2007;86:189–97.
 102. Tavares De Almeida I, Cortez-Pinto H, Fidalgo G, Rodrigues D, Camilo ME. Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Nutr*. 2002;21:219–23.
 103. Floegel A, Stefan N, Yu Z, Mühlenbruch K, Drogan D, Joost HG, et al. Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach. *Diabetes*. 2013;62:639–48.
 104. Ha CY, Kim JY, Paik JK, Kim OY, Paik YH, Lee EJ, et al. The association of specific metabolites of lipid metabolism with markers of oxidative stress, inflammation and arterial stiffness in men with newly diagnosed type 2 diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;76:674–82.
 105. Zhu C, Liang QL, Hu P, Wang YM, Luo GA. Phospholipidomic identification of potential plasma biomarkers associated with type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Talanta* [Internet]. 2011;85:1711–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.05.036>

106. Jonas A. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2000;1529:245–56. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VNN-41T1FT7-R/1/950547bd5442395f5bec77aea588c6ce%5Cnpapers2://publication/uuid/51034E11-DC3C-4412-B527-F3075889B251>
107. Da Silva IT, De Souza Timm A, Damasceno NRT. Influence of obesity and cardiometabolic makers on lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) activity in adolescents: The healthy young cross-sectional study. *Lipids Health Dis*. 2013;12:1–8.
108. Seyfarth J, Reinehr T, Hoyer A, Reinauer C, Bächle C, Karges B, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity in obese adolescents with and without type 2 diabetes. *J Inherit Metab Dis* [Internet]. 2017;41(1):73–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29027597>0A<http://link.springer.com/10.1007/s10545-017-0100-0>
109. Suhre K, Meisinger C, Döring A, Altmaier E, Belcredi P, Gieger C, et al. Metabolic footprint of diabetes: A multiplatform metabolomics study in an epidemiological setting. *PLoS One*. 2010;5(11):e13953.
110. Ma DWL, Arendt BM, Hillyer LM, Fung SK, McGilvray I, Guindi M, et al. Plasma phospholipids and fatty acid composition differ between liver biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease and healthy subjects. *Nutr Diabetes*. 2016;6:e220.
111. Wallner S, Schmitz G. Plasmalogens the neglected regulatory and scavenging lipid species. *Chem Phys Lipids* [Internet]. 2011;164:573–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.06.008>
112. Broniec A, Klosinski R, Pawlak A, Wrona-Krol M, Thompson D, Sarna T. Interaction of plasmalogens and their diacyl analogs with singlet oxygen in selected model systems. *Free Radic Biol Med*. 2011;50(7):892–8.
113. Colas R, Pruneta-Delocche V, Guichardant M, Luquain-Costaz C, Cugnet-Anceau C, Moret M, et al. Increased lipid peroxidation in LDL from type-2 diabetic patients. *Lipids* [Internet]. 2011;45(8):723–31. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2944870/>
114. Burgess JW, Neville TA-M, Rouillard P, Harder Z, Beanlands DS, Sparks DL. Phosphatidylinositol increases HDL-C levels in humans. *J Lipid Res* [Internet]. 2005;46:350–5. Available from: <http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.M400438-JLR200>
115. Leventis PA, Grinstein S. The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes. *Annu Rev Biophys* [Internet]. 2010;39:407–27. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biophys.093008.131234>

7. Anexos

Anexo A: Espécies moleculares pertencentes às classes PC, LPC, SM, PE, PG, PI e PS identificadas por HPLC-MS e MS/MS em amostras de soro de crianças com diferentes BMI.

Tabela A1- Lista das 166 espécies de fosfolípidos identificadas no soro de crianças de peso normal, com excesso de peso e com obesidade. A classe das PC, LPC, SM e PE foram analisadas no modo positivo na forma de íons $[M+H]^+$. A classe das PE foi, também analisada no modo negativo na forma de íons $[M-H]^-$.

PC, $[M+H]^+$			
Espécie molecular	m/z observado	Espécie molecular	m/z observado
PC(O-30:1) /PC(P-30:0)	690,54	PC(38:7)	804,55
PC(O-30:0)	692,56	PC(38:6)	806,57
PC(30:1)	704,52	PC(38:5)	808,58
PC(30:0)	706,54	PC(38:4)	810,60
PC(P-32:1)	716,56	PC(38:3)	812,61
PC(O-32:1) /PC(P-32:0)	718,57	PC(P-40:6)	818,60
PC(O-32:0)	720,59	PC(O-40:6) /PC(P-40:5)	820,62
PC(32:2)	730,54	PC(O-40:5) /PC(P-40:4)	822,64
PC(32:1)	732,55	PC(O-40:4) /PC(P-40:3)	824,65
PC(32:0)	734,57	PC(40:10)	826,54
PC(O-34:4) /PC(P-34:3)	740,56	PC(40:9)	828,55
PC(O-34:3) /PC(P-34:2)	742,57	PC(40:8)	830,57
PC(O-34:2) /PC(P-34:1)	744,59	PC(40:7)	832,58
PC(O-34:1) /PC(P-34:0)	746,60	PC(40:6)	834,60
PC(34:4)	754,54	PC(40:5)	836,61
PC(34:3)	756,55	PC(40:4)	838,63
PC(34:2)	758,57	PC(P-42:6)	846,64
PC(34:1)	760,58	PC(O-42:6) /PC(P-42:5)	848,65
PC(P-36:5)	764,56	PC(O-42:5) /PC(P-42:4)	850,67
PC(O-36:5) /PC(P-36:4)	766,57	PC(42:11)	852,55
PC(O-36:4) /PC(P-36:3)	768,59	PC(O-42:4) /PC(P-42:3)	852,68
PC(O-36:3) /PC(P-36:2)	770,60	PC(42:9)	856,59
PC(36:7)	776,52	PC(42:9)	856,59
PC(36:6)	778,54	PC(42:8)	858,60
PC(36:5)	780,55	PC(42:7)	860,61
PC(36:4)	782,57	PC(42:6)	862,63
PC(36:3)	784,58	PC(P-44:6)	874,67
PC(36:2)	786,60	PC(O-44:6) /PC(P-44:5)	876,69
PC(P-38:6)	790,57	PC(44:12)	878,57
PC(O-38:6) /PC(P-38:5)	792,59	PC(O-44:5) /PC(P-44:4)	878,70

PC(O-38:5) /PC(P-38:4)	794,61	PC(44:11)	880,58
PC(O-38:4) /PC(P-38:3)	796,62	PC(44:10)	882,60
PC(38:8)	802,54	PC(P-46:6)	902,70
LPC, [M+H]⁺			
Espécie molecular	m/z observado	Espécie molecular	m/z observado
LPC(14:1)	466,29	LPC(18:0)	524,37
LPC(14:0)	468,31	LPC(P-20:0)	536,41
LPC(O-16:1)/LPC(P-16:0)	480,35	LPC(O-20:0)	538,42
LPC(O-16:0)	482,36	LPC(20:5)	542,32
LPC(16:1)	494,32	LPC(20:4)	544,34
LPC(16:0)	496,34	LPC(20:3)	546,35
LPC(P-18:1)	506,36	LPC(20:2)	548,37
LPC(O-18:1)	508,38	LPC(20:1)	550,39
LPC(P-18:0)	508,38	LPC(20:0)	552,40
LPC(O-18:0)	510,39	LPC(22:6)	568,34
LPC(18:4)	516,31	LPC(22:5)	570,36
LPC(18:3)	518,32	LPC(22:4)	572,37
LPC(18:2)	520,34	LPC(24:0)	608,47
LPC(18:1)	522,36		
SM, [M+H]⁺			
Espécie molecular	m/z observado	Espécie molecular	m/z observado
SM(d30:1)	647,51	SM(d36:1)	731,61
SM(d32:2)	673,53	SM(d38:3)	755,61
SM(d32:1)	675,54	SM(d38:2)	757,62
SM(d32:0)	677,56	SM(d38:1)	759,64
SM(d34:2)	701,56	SM(d40:3)	783,64
SM(d34:1)	703,58	SM(d40:2)	785,65
SM(d34:0)	705,59	SM(d40:1)	787,67
SM(d36:3)	727,58	SM(d42:3)	811,67
SM(d36:2)	729,59	SM(d42:2)	813,68
PE, [M+H]⁺			
Espécie molecular	m/z observado	Espécie molecular	m/z observado
PE(30:3)	658,44	PE(38:9)	758,48
PE(O-34:3) /PE(P-34:2)	700,53	PE(38:7)	762,51
PE(34:2)	716,52	PE(38:6)	764,52
PE(34:1)	718,54	PE(38:4)	768,55
PE(O-36:5) /PE(P-36:4)	724,53	PE(O-40:10) /PE(P-40:9)	770,51
PE(O-36:4) /PE(P-36:3)	726,54	PE(O-40:9) /PE(P-40:8)	772,53
PE(O-36:3) /PE(P-36:2)	728,56	PE(O-40:8) /PE(P-40:7)	774,54
PE(36:4)	740,52	PE(O-40:7)/PE(P-40:6)	776,56

PE(36:3)	742,54	PE(O-40:5) /PE(P-40:4)	780,59
PE(P-38:8)	744,50	PE(40:10)	784,49
PE(36:2)	744,55	PE(40:9)	786,50
PE(O-38:8) /PE(P-38:7)	746,51	PE(40:8)	788,52
PE(O-38:7) /PE(P-38:6)	748,53	PE(40:6)	792,55
PE(O-38:6) /PE(P-38:5)	750,54	PE(40:5)	794,57
PE(O-38:5) /PE(P-38:4)	752,56	PE(42:10)	812,52
PE(O-38:4) /PE(P-38:3)	754,56	PE(42:9)	814,54
		PE(48:12)	892,59
PE, [M-H]⁻			
Espécie molecular	m/z observado	Espécie molecular	m/z observado
PE(O-34:3) /PE (P-34:2)	698,51	PE(O-38:4) /PE(P-38:3)	752,56
PE(O-34:2) /PE(P-34:1)	700,53	PE(38:6)	762,51
PE(34:2)	714,51	PE(38:5)	764,52
PE(34:1)	716,52	PE(38:4)	766,54
PE(O-36:5) /PE(P-36:5)	720,50	PE(38:3)	768,55
PE(O-36:5) /PE(P-36:4)	722,51	PE(O-40:9) /PE(P-40:8)	770,51
PE(O-36:4) /PE (P-36:3)	724,53	PE (O-40:8) /PE(P-40:7)	772,53
PE(O-36:3) /PE(P-36:2)	726,55	PE(O-40:7) /PE(P-40:6)	774,55
PE(O-36:2) /PE(P-36:1)	728,56	PE(O-40:6)/PE(P-40:5)	776,56
PE(O-38:7) /PE(P-38:6)	746,51	PE(O-40:5) /PE(P-40:4)	778,57
PE(O-38:6) /PE(P-38:5)	748,59	PE(40:7)	788,52
PE(O-38:5) /PE(P-38:4)	750,55	PE(40:5)	792,55
PG, [M-H]⁻			
Espécie molecular	m/z observado		
PG(38:7)	791,49		
PI, [M-H]⁻			
Espécie molecular	m/z observado	Espécie molecular	m/z observado
PI(30:2)	777,45	PI(36:1)	863,56
PI(34:2)	833,52	PI(38:5)	883,53
PI(34:1)	835,53	PI(38:4)	885,55
PI(36:4)	857,52	PI (38:3)	887,57
PI(36:3)	859,53	PI(42:0)	949,67
PI(36:2)	861,55		
PS, [M-H]⁻			
Espécie molecular	m/z observado	Espécie molecular	m/z observado
PS(30:2)	702,43	PS(48:12)	934,56